

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-112996

(43)公開日 平成7年(1995)5月2日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 15/12				
5/04				
C 1 2 Q 1/34		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 28 頁)

(21)出願番号	特願平6-179748	(71)出願人	591038141 實酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
(22)出願日	平成6年(1994)7月8日	(72)発明者	宮村 毅 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造 株式会社中央研究所内
(31)優先権主張番号	特願平5-227877	(72)発明者	佐野 睦 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造 株式会社中央研究所内
(32)優先日	平5(1993)8月23日	(72)発明者	近藤 昭宏 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造 株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 中本 宏 (外2名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖鎖構造決定方法

(57)【要約】

【目的】 より正確で、かつ簡便な糖鎖構造決定方法、該方法に用いるためのキット、及び標準物質として有用な新規のオリゴ糖を提供する。

【構成】 N-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法において、M3コアの α -マンノース残基 (α -Man) に β 結合しているN-アセチルグルコサミン残基 (GN) の非還元末端側の糖残基を、酵素的又は化学的処理後の当該GNの有無によって決定する糖鎖構造決定方法。16種類の標準となる比較同定用のオリゴ糖の少なくとも1種を含む上記の糖鎖構造決定用キット。前記16種類のうちの新規なオリゴ糖。

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法において、M3 コアの α -マンノース残基 (α -Man) に β 結合している N-アセチルグルコサミン残基 (GN) の非還元末端側の糖残基を、酵素的又は化学的处理後の当該 GN の有無によって決定することを特徴とする N-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法。

【請求項 2】 N-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法において、下記工程：

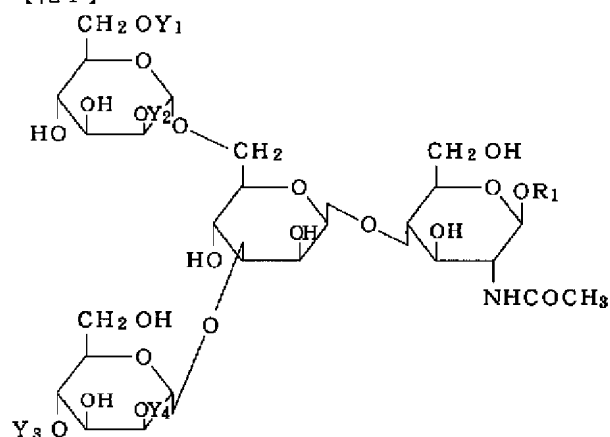
(1) M3 コアの α -Man に β 結合している GN を選択的に除去する工程、(2) 工程 (1) の生成物の M3 コアの α -Man に β 結合している GN の非還元末端側に糖残基が結合している場合はそれらの糖残基を除去する工程、(3) 工程 (1) 又は (2) の生成物を標準物質と比較、同定する工程、を含むことを特徴とする N-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法。

【請求項 3】 工程 (1) が、M3 コアの α -Man に β 結合している GN のうち、存在を決定すべき特定の糖残基を非還元末端側に有しない GN を除去する工程である請求項 2 に記載の糖鎖構造決定方法。

【請求項 4】 工程 (1) が、M3 コアの α -Man に β 結合している GN のうち、存在を決定すべき特定の糖残基を非還元末端側に有する GN を除去する工程である請求項 2 に記載の糖鎖構造決定方法。

【請求項 5】 請求項 1、2、3、又は 4 に記載の糖鎖構造決定方法に用いるためのキットであって、下記一般式 (化 1)：

【化 1】



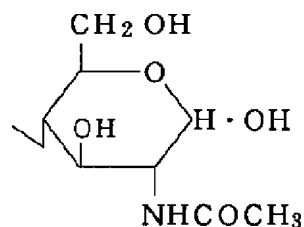
30

40

2

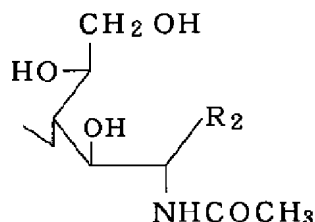
〔式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 はいずれも水素又は β -N-アセチルグルコサミン残基 (β -GN) を示し、 R_1 は下記式 (化 2) 又は (化 3)：

【化 2】



10

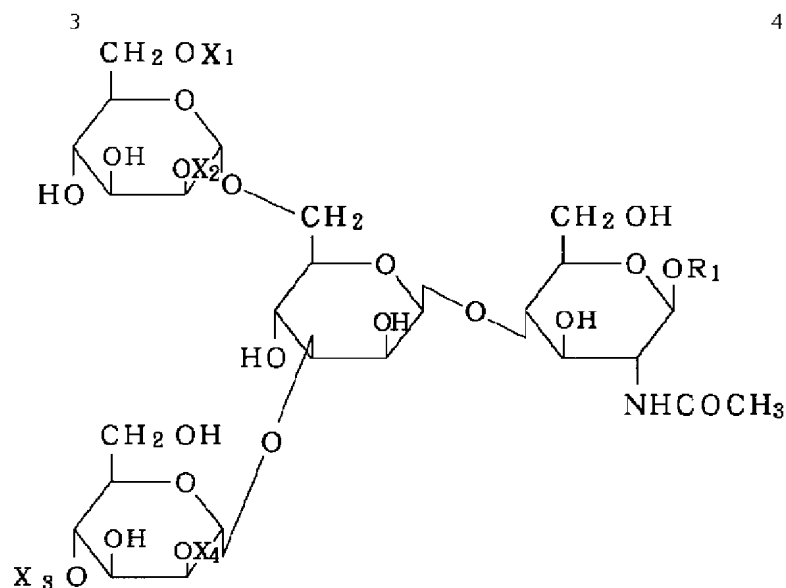
【化 3】



(式中、 R_2 はアルデヒド基、標識化されたメチレン基、又は標識化されたメチン基を示す) を表す〕で表されるオリゴ糖の少なくとも 1 種を含むことを特徴とする N-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定用キット。

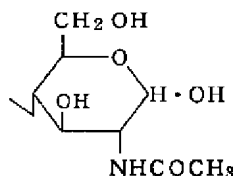
【請求項 6】 下記一般式 (化 4)：

【化 4】

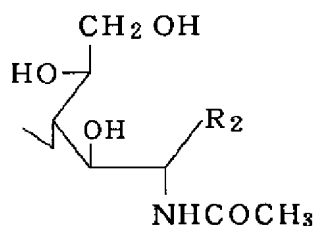


〔式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 はいずれも水素又は β -GN (ただし、 X_1 と X_3 の両方が水素の場合、あるいは X_2 と X_4 の両方が β -GNの場合を除く) を示し、 R_1 は下記式 (化2) 又は (化3) :

【化2】



【化3】



(式中、 R_2 はアルデヒド基、標識化されたメチレン基、又は標識化されたメチン基を示す) を表す) で表されるオリゴ糖。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、糖鎖構造決定方法、該方法に用いるためのキット、及び新規オリゴ糖に関し、更に詳細にはN-アセチルラクタサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法、糖鎖構造決定用キット、及びN-アセチルラクタサミン型糖鎖由来の新規オリゴ糖に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、細胞認識や細胞接着、あるいは癌の転移に糖鎖そのものが機能しているという証拠が数多く出されており、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質

中の糖鎖構造の解析は、ますます重要になっている。従来用いられてきた糖鎖構造解析方法としては、メチル化分析、過ヨウ素酸酸化、酵素消化などの分析法のほか、核磁気共鳴法や質量分析器による分析が行われている。これらの技術に加えて、最近急速に発展してきた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて糖鎖を分析することが可能となっている。特に長谷らによって開発された糖鎖の蛍光標識法であるピリジル (-2-) アミノ化 (PA化) 法 [ジャーナル オブ バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、第95巻、第197~203頁 (1984)] と2種類のカラムを用いてHPLC分析を行う、いわゆる2次元マッピング法を組合せて、多種類の糖鎖を簡便かつ高感度で分析することが可能となっている [アナリティカル バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第171巻、第73~90頁 (1988)]。しかし、この方法では、2種類のカラムでの溶出位置が同じかあるいは非常に近い複数の糖鎖を区別することはできない。更に、この方法はマップに記載されていない糖鎖、特にシアル酸を持つ糖鎖に対しては無効であり、構造が未知の糖鎖の構造決定の方法としては適当ではない。PA化とHPLCとの組合せに限らず、他のいかなる標識方法や分離方法でも、クロマトグラフィーのみで糖鎖の構造を決定しようとした場合、存在する可能性のあるすべての糖鎖が、既に何らかの方法で構造決定された標準物質として手元にあり、それらがクロマトグラフィーにて分離同定できなければ、ただ1つの構造には決定できないが、糖鎖の多様性を考慮すると、それはまず不可能である。そこで通常は、糖鎖が特異的エキソグリコシダーゼで消化されるかどうかを、クロマトグラフィーにて逐次確認していく方法を併用することにより糖鎖の構造を決定している [例えば、E. ツダ (Tsuda) ら、バイオケミストリー (Biochemistry)、第27巻、第5646~5654頁 (19

20

30

40

50

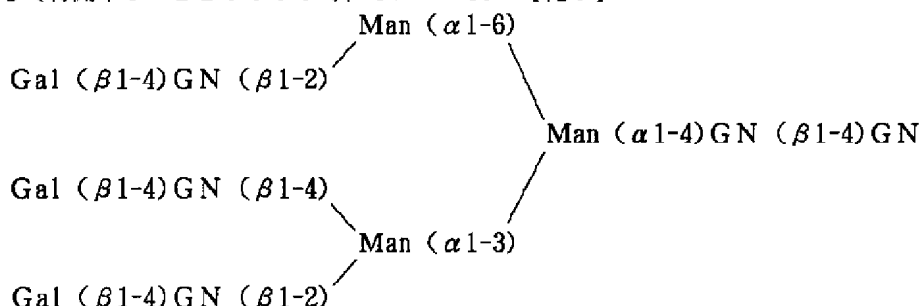
88)」。以下、特異的エキソグリコシダーゼによる消化を単に酵素消化と記述する。特異的エキソグリコシダーゼには、糖鎖の非還元末端糖残基の種類と α 、 β といったアノマー型、及び糖残基が置換している水酸基の位置を綿密に認識しうるものが多く存在する(以後、アノマー型と、糖残基の置換している還元末端側の水酸基の位置とを合せた、例えば $\alpha-2, 3$ 結合、 $\beta-1, 4$ 結合といったものを結合様式と表現する)。例えば、肺炎球菌より得られる β -ガラクトシダーゼは、 $\beta-1, 4$ 結合した非還元末端ガラクトース残基のみを認識し加水分解するし、タチナタマメより得られる β -ガラクトシダーゼは、 β 結合した非還元末端ガラクトース残基を認識し加水分解する。こういったエキソグリコシダーゼの特異性を利用して、糖鎖の非還元末端の糖残基の種類と結合様式とを推定することができる。例えば糖鎖サンプルが肺炎球菌の β -ガラクトシダーゼによって消化されうらば、その糖鎖が非還元末端に $\beta-1, 4$ 結合したガラクトースを有していることを推定できる。酵素消化は通常、逐次消化が行われている。例えば、糖鎖サンプル1が酵素Aで消化されたとすると、消化産物の糖鎖サンプル2が得られる。糖鎖サンプル2を回収し、続いて酵素Bで消化すると、糖鎖サンプル3が得られ、これを更に酵素Cで消化するという操作を繰返すのである。しかしながら、酵素消化によって構造決定する方法は、微細な構造の違いを区別できる反面、酵素反応とクロマトグラフィーによる反応生成物の分析と回収を繰返さなければならぬため、多大な労力と、時間を費やすという欠点をもっている。こうして欠点を補うため、糖鎖の酵素消化を体系的に行い、糖鎖の構造を推定する方法が開発されている〔特開平3-228698号、C. *30

* J. エッジ (Edge) ら、プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A)、第89巻、第6338~6342頁(1992)〕。

【0003】前記方法は、実質上、構造決定すべき糖鎖サンプルを

- 1、いくつか等に等分割し、
- 2、それぞれを異なる酵素混合物で完全消化し、
- 3、これらの最終反応生成物を混合したのち、分析クロマトグラフィーに供し、
- 4、その分析スペクトル、すなわち、ピークの溶出位置とピークの強度をデータベース中の糖鎖の構造から理論的に導かれるスペクトルと比較し、
- 5、糖鎖サンプルのスペクトルと統計学的に最も近いスペクトルを与える糖鎖の構造をデータベースの中から検索し、これをもって糖鎖サンプルの構造であると推定する、という一連の操作を行うことを特徴としている。この方法では、分析クロマトグラフィーは1回で済み、また、分析した糖鎖の回収をする必要が無いので、この方法により、酵素消化による糖鎖構造解析の簡便化、迅速化が実現されている。しかしながら、この方法は実験スペクトルと理論スペクトルとの近似を行う方法であるため、元々から実験値と理論値との間に隔たりがある場合、あるいは、理論スペクトルを全く同じくするか、あるいは酷似した複数の糖鎖がデータベース上に存在する場合などには、推定される構造が誤っていたり、あるいは、提示される推定構造が複数になったりすることがある。例えば、上記エッジらの文献の方法によれば、下記式(化5)：

【0004】
【化5】



【0005】に示す簡単な構造のものですら理論的には2つの構造が全く同じ確からしさを提示され、結局は1つの構造に決定することができない。この問題点は、より綿密な結合特異性をもつ酵素を酵素混合物に加えることにより、解決され得ると著者らは述べているが、用いる酵素の数を増やせば、その分だけ多くの酵素混合物を用意する必要が生じ実用的ではない。しかも、こういった特異的酵素の種類にも限界があり、データベース中のすべての理論スペクトルが区別できるような酵素混合物を構築することは事実上不可能である。更に、この方法

には重大な欠点が存在する。すなわち、多くの糖鎖、特にアスパラギン結合型糖鎖は、直鎖状ではなく、複雑に分枝しており、そのため1つの糖鎖が複数の非還元末端糖残基を有している。ところがこの方法では、酵素消化によって、非還元末端糖残基の種類と数、そして結合様式が判明したとしても、その残基が、複数存在する非還元末端のいずれであるか、すなわちその残基がどの枝の非還元末端糖残基なのかということまでは決定できず、ただ1つの構造に決定できない。また、この方法は、実験スペクトルを乱すような要因、例えば用いる酵素の活性の低

下、あるいは意図せざる酵素活性の微量混入、あるいは異種糖鎖の混入によって、スペクトルは大いに影響を受ける。ところが、得られたスペクトルが正しいものであるかどうかを検定するすべがない。したがって、この方法は、分析法自体は簡便かつ迅速ではあるが、スペクトルの信頼性に欠け、構造解析の手段としては決して満足できるものではない。

【0006】この方法の上記に挙げたような欠陥の原因は、個々の反応生成物を同定できないことにある。同定とは、すなわち、構造未知の物質を、クロマトグラフィー等の手法を用いて、構造が既知の物質と同一であるということを示すことである。したがって、同定には、存在の可能性のあるすべての標準物質をそろえ、しかもそれらすべてが、何らかの方法で区別されることが必須である。しかしながら、この方法で生じる可能性のある生成物の数は膨大であり、それらすべてを標準物質としてそろえ、それらを分離区別することは不可能である。それ故この方法では、実験スペクトルを理論スペクトルへ近似することによって同定に替わるものとしているのである。しかしながら、本来、物質の構造決定のためには、近似というあいまいな手法を用いるべきではなく、近似を行う限り、構造がただ1つに決定されなかったり、誤った構造が提示されたりする危険を常に伴っていた。したがって、より正確でかつ簡便な糖鎖構造決定方法の開発が望まれていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、より正確でかつ簡便な糖鎖構造決定方法、該方法に用いるためのキット、及び標準物質として有用な新規のオリゴ糖を提供することにある。

【0008】

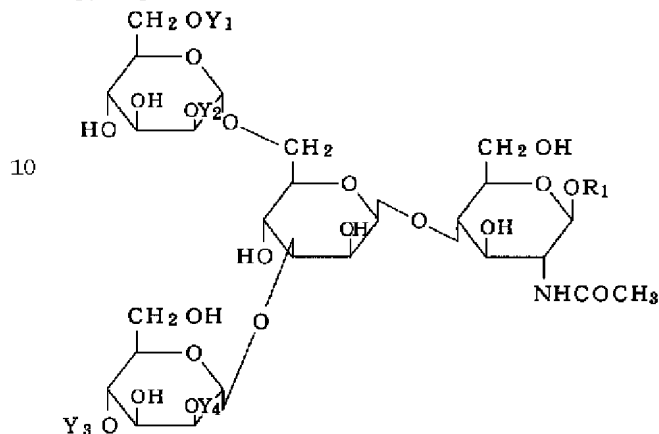
【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はN-アセチラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法に関し、M3コアの α -マンノース残基(α -Man)に β 結合しているN-アセチルグルコサミン残基(GN)の非還元末端側の糖残基を、酵素的又は化学的処理後の当該GNの有無によって決定することを特徴とする。本発明の第2の発明はN-アセチラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法に関し、下記工程：

(1) M3コアの α -Manに β 結合しているGNを選択的に除去する工程、(2) 工程(1)の生成物のM3コアの α -Manに β 結合しているGNの非還元末端側に糖残基が結合している場合はそれらの糖残基を除去する工程、(3) 工程(1)又は(2)の生成物を標準物質と比較、同定する工程、を含むことを特徴とする。本

発明の第3の発明は第1又は第2の発明の糖鎖構造決定方法に用いるためのキットに関し、下記一般式(化1)：

【0009】

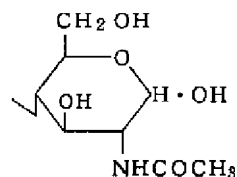
【化1】



【0010】〔式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 はいずれも水素又は β -N-アセチルグルコサミン残基(β -GN)を示し、 R_1 は下記式(化2)又は(化3)：

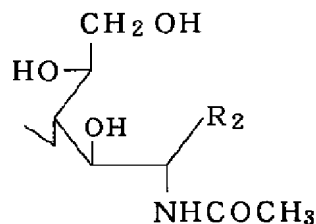
【0011】

【化2】



30 【0012】

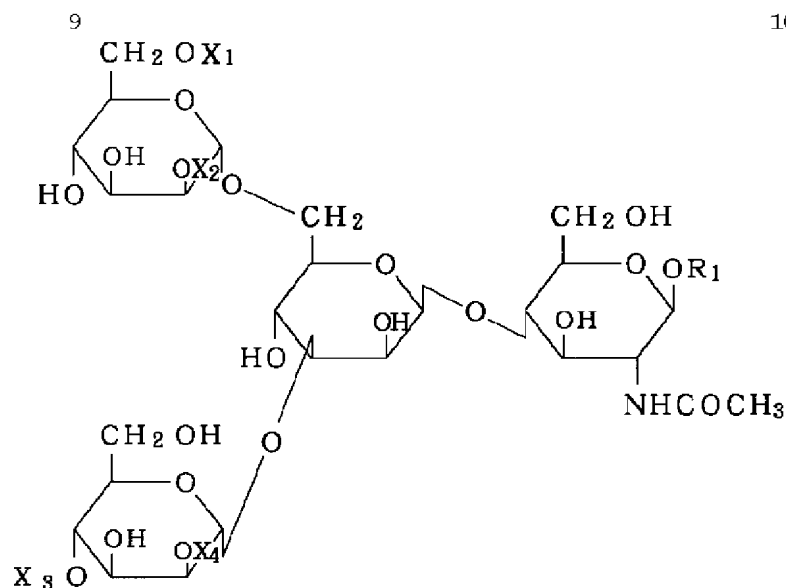
【化3】



40 【0013】〔式中、 R_2 はアルデヒド基、標識化されたメチレン基、又は標識化されたメチン基を示す〕で表されるオリゴ糖の少なくとも1種を含むことを特徴とする。本発明の第4の発明は、下記一般式(化4)：

【0014】

【化4】



【0015】〔式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 はいずれも水素又は β -GN（ただし、 X_1 と X_3 の両方が水素の場合、あるいは X_2 と X_4 の両方が β -GNの場合を除く）を示し、 R_1 は前記式（化2）又は（化3）を表す〕で表されるオリゴ糖に関する。

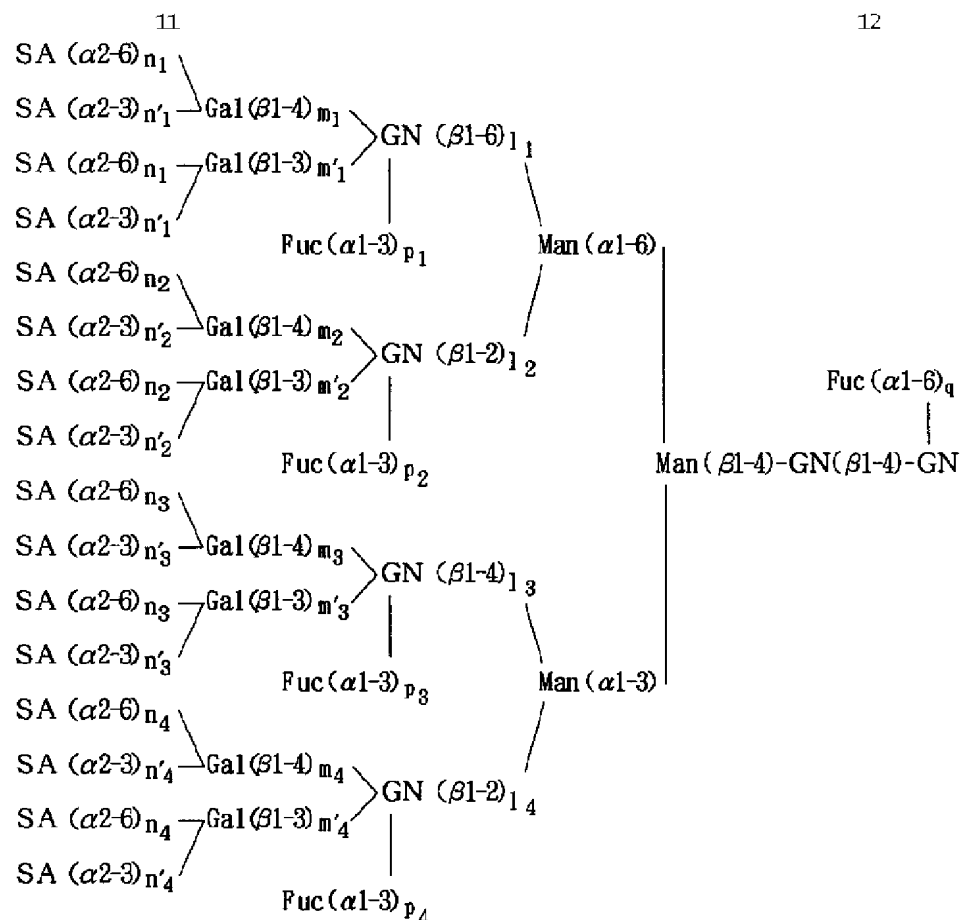
【0016】本発明者らは鋭意研究の結果、糖鎖構造の解析に際し、同定という工程を用いるべく生成する可能性のある最終生成物の数が限定されるような糖鎖試料の

処理の方法を開発した。更に、該方法に用いるためのキットを構築した。更に、同定の際の標準物質として有用な新規オリゴ糖を取得し、本発明を完成した。

【0017】以下、本発明を詳細に説明する。N-アセチルラクトサミン型糖鎖には、例えば下記一般式（化6）で表されるものがある。

【0018】

〔化6〕

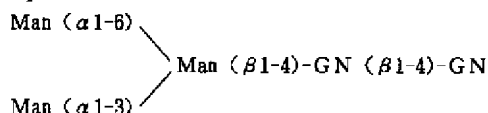


【0019】〔式中、SAはシアル酸残基、Galはガラクトース残基、GNはN-アセチルグルコサミン残基、Fucはフコース残基、Manはマンノース残基を表し、各残基の後の括弧中は結合様式を表す。また、 l_x 、 m_x 、 m'_x 、 n_x 、 n'_x 、 p_x ($x=1, 2, 3, 4$) 及び q は変数であり、それぞれ0又は1を表す。ただし、 $m_x m'_x = n_x n'_x = m'_x p_x = 0$ 、かつ $l_x \geq m_x$ 、 $m'_x \geq n_x$ 、 n'_x 、かつ $l_x \geq p_x$ である〕

【0020】N-アセチルラクトサミン型糖鎖はその微細構造には多様性をもっているが、基本構造においては、下記式(化7)：

【0021】

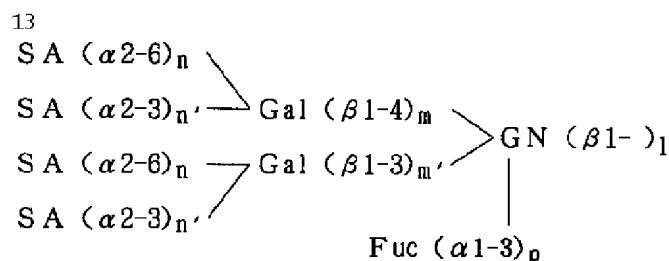
〔化7〕



【0022】で表される基本骨格(以後M3コアと称す)を有しており、通常の構造は上記式(化6)ですべて表される。すなわち、N-アセチルラクトサミン型糖鎖はM3コアから4つのGNによって枝別れた樹状構造をしており、それぞれの枝(以後、枝分かれしたGNとその非還元末端側の糖残基とを合せた集団を“枝”と表す)は、GN、Gal、SA、Fucの糖残基より構成される。Gal、SAについては、Gal β -1, 3と β -1, 4、SA α -2, 3と α -2, 6のそれぞれ2つの結合様式の可能性があり、それらは区別される必要がある。各枝の構成糖残基の数は多くても1つで、しかもその配列順序が決まっており、各枝の内容は、一般的には下記式(化8)：

【0023】

〔化8〕



【0024】〔式中、1、m、m'、n、n'、pは変数であり、それぞれ0又は1を表す。ただし、 $mm' = nn' = m'p = 0$ かつ $1 \geq m$ 、 $m' \geq n$ 、 $n' \geq 1$ かつ $1 \geq p$ である〕で表される。

【0025】各枝の各糖残基の数は0か1かに限定されており、しかもその配列順序が既に式(化8)のように規定されているため、N-アセチルラクトサミン型糖鎖の構造を決定するためには、枝ごとの各糖残基の有無を決定するだけでよく、糖残基の配列順序はおのずと決定される。枝ごとの各糖残基の有無を決定することは、各糖残基ごとに糖残基が存在する枝を決定することと同義であるから、各糖残基ごとに、それぞれがどの枝に存在しているかを決定することで、N-アセチルラクトサミン型糖鎖の構造を決定することができる。

【0026】次に、ある糖残基が存在する枝がどの枝なのか(枝情報)を決定する方法について述べる。本発明の方法の代表的な態様においては、存在を決定すべき特定の糖残基について、該糖残基が存在しない枝を酵素的あるいは化学的処理によって除去することによって、該糖残基が存在する枝と存在しない枝を区別する。

【0027】GN、Gal、SA、Fucのそれぞれの糖残基が存在しない枝の除去は、例えば以下のようにしてできる。GNの存在しない枝は当然、枝そのものが存在しないわけであるから、GNの存在しない枝を選択的に除去する必要はない。

【0028】Galの存在しない枝には、GN、Fucが存在する可能性があるため、例えば、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 α -フコシダーゼで糖鎖を処理すれば枝を除去できる。Galの存在する枝は、GNがGalによって保護されているため、この処理では除去されない。

【0029】SAの存在しない枝には、GN、Gal、Fucが存在する可能性があるため、例えば、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -フコシダーゼで糖鎖を処理すれば枝を除去できる。SAの存在する枝はGN、GalがSAによって保護されているため、この処理では除去されない。Fucの存在しない枝にはGN、Gal、SAが存在する可能性があるため、例えば、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、シアリダーゼで糖鎖を処理すれば、枝を除去できる。Fucの存在する枝はGNがFucで保護されているため、この処理では除去されない。

【0030】以上のようにして、GN、Gal、SA、Fucの各糖残基が存在しない枝を選択的に除去したのち、次に残存している枝を判別する必要がある。そのために、残存している枝を酵素的あるいは化学的方法を用いて最も簡単な構造、すなわちGN残基のみにする。そうすることによって、理論的に期待される生成物の数を大幅に減らすことができ、以降の分析を容易にすることができる。すなわち、M3コアにGNが結合しただけのものを挙げると、4つのGNそれぞれに、「有り」、「なし」、の2つの可能性があるため、M3コアも含めて、 $2 \times 2 \times 2 \times 2 = 16$ 種類になる。これらの構造は、表1に示した。糖鎖の処理生成物を、これら16種のいずれかに同定することで、処理生成物の各枝の有無が判定できる。ただし、これら16種の糖鎖がなんらかの方法で分離されることが前提である。

【0031】以上のように、各枝のうち目的の糖残基の存在する枝のGNのみが残るように処理することができ、かつ、表1に示した16種の糖鎖を、クロマトグラフィーなどの方法によって分離同定することができれば、枝を構成するすべての糖残基について、糖残基が存在する枝を判別できるはずである。これらを基にして、式(化6)に示したN-アセチルラクトサミン型糖鎖の構造はただ1つに決定される。

【0032】以下に、グリコシダーゼによる酵素消化を糖鎖の処理の手段とした方法を説明する。通常のN-アセチルラクトサミン型糖鎖はその(i)GNの結合位置、(ii)Galの結合位置と結合様式、(iii)SAの結合位置と結合様式、(iv)Fucの結合位置をそれぞれ決定すればその構造を一義的に決定することができる。

【0033】GNの結合可能位置は通常の糖鎖ではGN($\beta 1-6$)Man($\alpha 1-6$)、GN($\beta 1-2$)Man($\alpha 1-6$)、GN($\beta 1-4$)Man($\alpha 1-3$)、GN($\beta 1-2$)Man($1-3$)の4箇所が考えられる。すなわちそのいずれにGNが結合しているかを決定するということは式(化6)の4つの変数、 1_1 、 1_2 、 1_3 、 1_4 を決定することである。

【0034】Galの結合可能な糖残基は、上述の4個のGNであり、Galの結合様式は $\beta-1$ 、3と $\beta-1$ 、4の2種類が考えられる。したがって、Galの結合位置と結合様式を決定するということは、式(化6)の8つの変数、 m_1 、 m'_1 、 m_2 、 m'_2 、 m_3 、 m'_3 、 m_4 、 m'_4 を決定することである。ただし、

1つのGNに複数のGalが結合することはないので、任意の x ($x=1, 2, 3, 4$) について $m_x, m'_x = 0$ である。また、Galが結合するのはGNのみであるから、任意の x について $l_x = 0$ ならば $m_x, m'_x = 0$ 、すなわち $l_x \geq m_x, m'_x$ である。

【0035】SAはGalに $\alpha-2, 3$ と $\alpha-2, 6$ の2種類の結合様式で結合することが可能である。したがって、SAの結合位置と結合様式を決定するということは、前記式(化6)の8つの変数、 $n_1, n'_1, n_2, n'_2, n_3, n'_3, n_4, n'_4$ を決定することである。ただし、1つのGalに複数のSAが結合することはないので、任意の x ($x=1, 2, 3, 4$) について $n_x, n'_x = 0$ である。また、SAが結合するのはGalのみであるから、任意の x について $m_x, m'_x = 0$ ならば、 $n_x, n'_x = 0$ 、すなわち、 $m_x, m'_x \geq n_x, n'_x$ である。

【0036】FucはN-アセチラクトサミン型糖鎖の還元末端のGNに $\alpha-1, 6$ 結合で、Manの非還元末端側の4つのGNに $\alpha-1, 3$ で結合することが可能である。したがって、Fucの結合位置と結合様式を決定するということは、前記式(化6)の5つの変数、 q, p_1, p_2, p_3, p_4 を決定することである。ただし、GNにGalが $\beta-1, 3$ で結合している場合、*

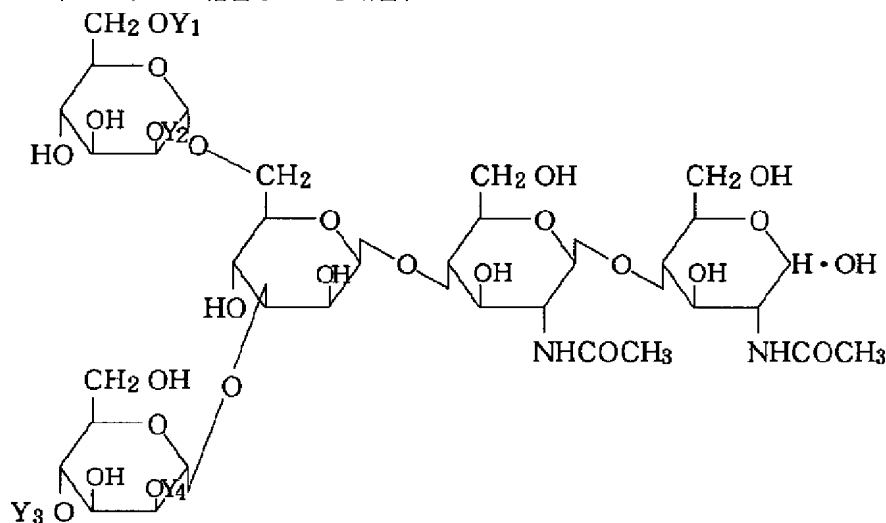
*そのGNにFucが $\alpha-1, 3$ で結合することはない。すなわち、任意の x ($x=1, 2, 3, 4$) について $p_x, m'_x = 0$ である。また、Fucが結合しうるのはGNのみであるから $l_x = 0$ ならば $p_x = 0$ 、すなわち $p_x \leq l_x$ である。

【0037】ある糖鎖の(i)GNの結合位置、(ii)Galの結合位置と結合様式、(iii)SAの結合位置と結合様式、及び(iv)Fucの結合位置は、糖鎖を少なくとも1種のグリコシダーゼによって消化し、その反応生成物を分析することによって決定することができる。すなわち、M3コアに結合しているGNのみが残るような酵素反応、Galが結合していたGNのみが残るような反応、SAの還元末端側に存在するGNのみが残るような反応、Fucが結合していたGNのみが残るような反応をそれぞれ設定し、それぞれの反応生成物を標準物質を用いて同定することにより、糖鎖全体の構造を決定することができる。

【0038】まず本発明における標準物質について述べる。M3コアにGNのみが結合している糖鎖としては、下記式(化9)：

【0039】

【化9】



【0040】(式中、 Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 は、いずれも水素又は β -GNを示す)で表される16種がある。この16種の標準物質と最終反応生成物を比較することにより、該最終反応生成物のM3コアへのGN結合※

40※位置が決定される。16種の糖鎖、すなわちオリゴ糖I～XVIと β -GN結合位置の関係を表1に示す。

【0041】

【表1】

1

オリゴ糖	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
I :	H	H	β -GN	H
II :	H	β -GN	β -GN	H
III :	H	H	β -GN	β -GN

17				18
IV	:	H	H	H
V	:	H	β -GN	H
VI	:	H	H	β -GN
VII	:	H	β -GN	β -GN
VIII	:	H	β -GN	β -GN
IX	:	β -GN	H	β -GN
X	:	β -GN	β -GN	H
XI	:	β -GN	H	β -GN
XII	:	β -GN	H	H
XIII	:	β -GN	β -GN	H
XIV	:	β -GN	H	β -GN
XV	:	β -GN	β -GN	β -GN
XVI	:	β -GN	β -GN	β -GN

【0042】オリゴ糖I～XVIはN-アセチルラクタサミン型糖鎖を調製し、次いで、グリコシダーゼで逐次分解することにより調製することができる。例えば、オリゴ糖XVIはヒトの α_1 -アシッドグリコプロテイン（シグマ社）をヒドラジン分解、N-アセチル化することによって得られる糖鎖をシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、フコシダーゼで完全消化することによって調製することができる。更に、オリゴ糖XVIをウシ腎臓由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼにより部分消化することにより、オリゴ糖I～XVIの混合物を調製することができる。これ

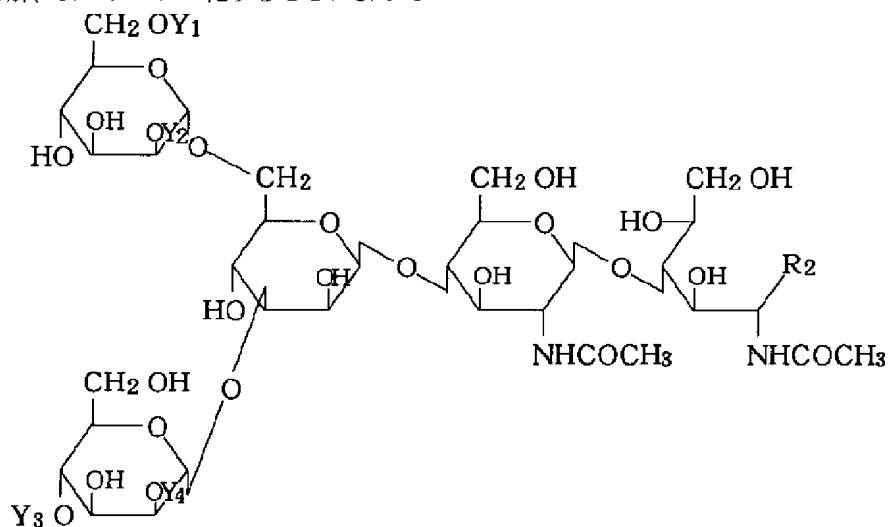
【0043】また、例えばオリゴ糖VIIIはウシフェツインをヒドラジン分解、N-アセチル化することによって*

*得られる糖鎖をシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼで完全消化することによって調製することができる。更に、オリゴ糖VIIIをウシ腎臓由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼにより部分消化することによりオリゴ糖I～VIIIの混合物を調製することができ、これらはHPLC等で分取することができる。これらのオリゴ糖は、例えばパルス電気化学的検出（PAD）によって高感度に検出することができる。

【0044】これらのオリゴ糖はそのまま用いてもよいが、下記式（化10）：

【0045】

【化10】



【0046】（式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 はいずれも水素又は β -GNであり、 R_2 はアルデヒド基、標識化したメチレン基、又は標識化したメチン基を示す）で表されるように修飾化して用いてもよい。

【0047】メチレン基の標識化の例としては、PA化による方法〔アグリカルチュラルアンド バイオロジカル ケミストリー〔Agricultural and Biological Chem

istry）、第54巻、第2169～2170頁（1990）〕、パラアミノ安息香酸エチル（ABEE）による方法〔アナリティカル バイオケミストリー、第141巻、第366～381頁（1984）〕、8-アミノナフタレン-1, 3, 6-トリスルホン酸（ANTS）による方法〔バイオケミカル ジャーナル（Biochemical Journal）、第270巻、第705～713頁（199

0)〕が挙げられる。

【0048】また、メチン基の修飾化の例としては、トリチウムによる放射性標識〔メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第50巻、第50頁(1978)〕、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP) による方法〔アナリティカル バイオケミストリー、第180巻、第351～357頁(1989)〕が挙げられる。

【0049】例えば、PA化オリゴ糖の例としては表1のオリゴ糖I～XVIをPA化したものが挙げられる(以下、オリゴ糖IのPA化物をI-PAと称す。II～XVIについても同様とする)。オリゴ糖I-PA～VII-PAは例えばオリゴ糖VIIIを前記の方法でPA化してVIII-PAを調製し、次いで、VIII-PAをウシ腎臓由来β-N-アセチルグルコサミニダーゼで部分消化してHPLCで分取することにより調製することができる。同様に、IX-PA～XV-PAは例えばオリゴ糖XVIをPA化してXVI-PAを調製し、次いで、XVI-PAをウシ腎臓由来β-N-アセチルグルコサミニダーゼで部分消化してHPLCで分取することにより調製することができる。I-PA～XVI-PAはHPLCにより分離することができる。これらを標準物質として、前記の最終酵素反応生成物を同定することができる。

【0050】I-PA～VIII-PAの8種の混合物は、例えば、バルバックタイプR (PALPAK TYPE R、宝酒造社)を用いたHPLC〔溶離液: 0.035%1-ブタノールを含む100mM酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0)〕にて分離することができる。図1に、I-PA～VIII-PAの等モル混合物を分離した例を示す。なお、図1において、縦軸は相対蛍光強度、横軸は溶出時間(分)を示す(以下の各図においても同義である)。

【0051】I-PA～XVI-PAの16種の混合物についてもHPLCにより分離することができる。例えば、まず混合物をバルバックタイプN (宝酒造社)を用いたHPLC〔溶離液: 50mM酢酸-トリエチルアミン (pH 7.3)、アセトニトリル70% (0分)→50% (300分)のリニアグラジェント〕に供し、糖鎖基の数の違いで分離する。図2にその例を示す。すなわち、図2の13～17分には、M3コアにGNが全く結合していないもの、すなわちIV-PAが溶出し、同様に、18～23分にGNが1個結合したもの(I-PA、V-PA、VI-PA、XII-PA)、24～29分にGNが2個結合したもの(II-PA、III-PA、VII-PA、IX-PA、XIII-PA、XIV-PA)、32～38分にGNが3個結合したもの(VIII-PA、X-PA、XI-PA、XV-PA)、42～46分にGNが4個結合したもののすなわちXVI-PAが溶出する。

【0052】次に、18～23分のフラクション(フラクション2)を更にバルバックタイプRを用いたHPLC〔溶離液: 0.07%1-ブタノールを含む100m

M酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0)〕に供するとGNが1個結合した4種、すなわちI-PA、V-PA、VI-PA、XII-PAが分離される。図3にその例を示す。同様にして、32～38分のフラクション(フラクション4)についてもVIII-PA、X-PA、XI-PA、XV-PAの4種が分離される。図4にその例を示す。24～29分のフラクション(フラクション3)についてバルバックタイプRを用いたHPLC〔溶離液: 0.035%1-ブタノールを含む100mM酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0)〕に供すると、II-PA、III-PA、VII-PA、IX-PA、XIII-PA、XIV-PAの6種が分離される。図5にその例を示す。以上のようにして、I-PA～XVI-PAの16種のオリゴ糖を分離することができる。

【0053】これら16種のPA化オリゴ糖は、図2～図5の各ピークを分取して単離することができる。なお、XIV-PAに関しては図5のピークをそのまま分取してもよいが、以下の方法によればより簡単に分取することができる。すなわち、フラクション3の一部をβ-1, 2結合特異的な肺炎球菌由来β-N-アセチルグルコサミニダーゼで完全消化して図5と同じ条件でHPLCに供すると、III-PAとVII-PAのピークが消失し(加水分解されてそれぞれI-PA、IV-PAが生成する)、XIV-PAのみが加水分解されずに残るので、その残ったピークを分取すればよい。図6にその例を示す。また、IX-PA～XV-PAはXVI-PA、例えば市販のPA-シュガーチェイン004 (宝酒造社)を原料にしてシアリルトランスフェラーゼとガラクトースオキシダーゼとを用いて効率よく生産することもできる。

【0054】また、これらI-PA～XVI-PAの混合物はバルバックNを用いてHPLC〔溶離液: 50mM酢酸-トリエチルアミン (pH 7.3)、アセトニトリル70% (0分)→50% (300分)のリニアグラジェント〕及びバルバックRを用いたHPLC〔溶離液: 0.02%1-ブタノールを含む100mM酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0)〕に供し、それぞれの条件でのオリゴ糖の溶出パターンと溶出位置を2次元的にプロットすることにより、更に簡単に分離することができる。図7にその例を示す。I-PA、II-PA、III-PA、IX-PA、X-PA、XI-PA、XII-PA、XIII-PA、XIV-PAの物性を以下に示す。更に、図8及び図9にI-PAの、図10及び図11にII-PAの、図12及び図13にIII-PAの、図14にIX-PAの、図15及び図16にX-PAの、図17にXI-PAの、図18にXII-PAの、図19にXIII-PAの、図20にXIV-PAのプロトン核磁気共鳴(¹H-NMR)スペクトルを示す。なお、¹H-NMRでの化学シフト値は、テトラメチルシランを基準としたときの37°C、重水中でのアセトンのメチルプロトンの化学シフト値を2.218ppmとして表した。図

9、図11、図13～15、図17～20において2.218ppmに見られるシグナルは、内部標準に用いたアセトンのメチルプロトンのシグナルである。

【0055】(I-PAの物性)

分子量 1192.7 (質量分析による)

¹H-NMR 4.556 (H-1、GN-7)、
2.067 (NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:2.5、GalとFucは無し。

【0056】(II-PAの物性)

分子量 1395.4 (質量分析による)

¹H-NMR 4.541 (H-1、GN-5')、
4.556 (H-1、GN-7)、2.040 (NAc、GN-5')、
2.066 (NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0057】(III-PAの物性)

分子量 1395.5 (質量分析による)

¹H-NMR 4.527 (H-1、GN-5)、
4.515 (H-1、GN-7)、2.045 (NAc、GN-5)、
2.067 (NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0058】(IX-PAの物性)

分子量 1395.0 (質量分析による)

¹H-NMR 4.552 (H-1、GN-7')、
4.535 (H-1、GN-5)、2.046 (NAc、GN-7')、
2.046 (NAc、GN-5)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0059】(X-PAの物性)

分子量 1599.0 (質量分析による)

¹H-NMR 4.528 (H-1、GN-7')、
4.549 (H-1、GN-5')、4.557 (H-1、GN-7)、
2.028 (NAc、GN-7')、
2.038 (NAc、GN-5')、2.067 (NA*

*c、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:4.5、GalとFucは無し。

【0060】(XI-PAの物性)

分子量 1598.0 (質量分析による)

¹H-NMR 4.546 (H-1、GN-7')、
4.515 (H-1、GN-7)、4.529 (H-1、GN-5)、
2.045 (NAc、GN-7')、
2.065 (NAc、GN-7)、2.045 (NAc、GN-5)

糖組成 Man:GN=3.0:4.5、GalとFucは無し。

【0061】(XII-PAの物性)

分子量 1191.5 (質量分析による)

¹H-NMR 4.542 (H-1、GN-7')、
2.043 (NAc、GN-7')

糖組成 Man:GN=3.0:2.5、GalとFucは無し。

【0062】(XIII-PAの物性)

分子量 1195.0 (質量分析による)

¹H-NMR 4.530 (H-1、GN-7')、
4.548 (H-1、GN-5')、2.027 (NAc、GN-7')、
2.038 (NAc、GN-5')

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0063】(XIV-PAの物性)

分子量 1395.0 (質量分析による)

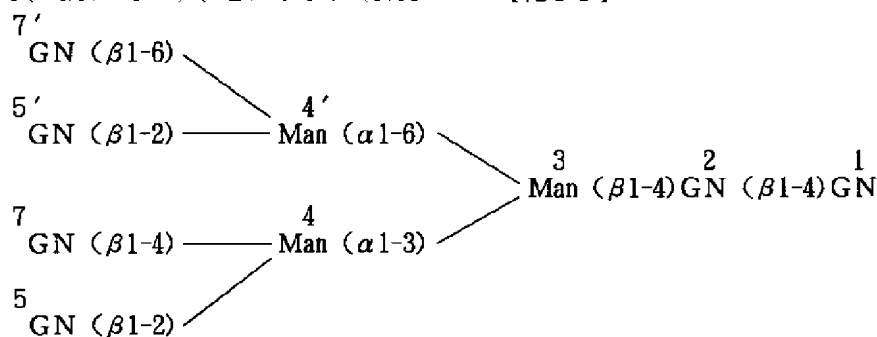
¹H-NMR 4.545 (H-1、GN-7')、
4.556 (H-1、GN-7)、2.043 (NAc、GN-7')、
2.065 (NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0064】なお、¹H-NMRにおける糖残基の番号は下記式(化11)のとおりである。

【0065】

【化11】



【0066】本発明の糖鎖構造決定方法を酵素的処理によって行う場合は解析対象の糖鎖に対し、通常は途中に反応停止操作を含む1段階あるいは多段階のグリコシダ

ーゼによる酵素消化を行った後、反応生成物を前出の標準物質と比較、分析する。

【0067】解析対象となる糖鎖は前記式(化6)で導

かれるものであればどんなものでもよい。また、前記式(化6)に合致しないものであっても、酵素的、化学的処理により前記式(化6)に合致させることができるものあれば本発明の方法による解析対象となりえる。例えば、Ga1の還元末端側に、N-アセチルラクタサミン〔-Ga1(β 1-4)GN(β 1-3)-〕の繰返し構造をもつ糖鎖が知られているが、これは式(化6)で表記されないものである。しかし、N-アセチルラクタサミンの繰返し構造をもつ糖鎖は、 β -ガラクトシダーゼ消化と β -N-アセチルグルコサミニダーゼ消化とを順番に繰返すことによって、式(化6)に合致させることができる〔T. オオクラ(Ohkura)ら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第256巻、第8485~8490頁、(1981)〕。あるいはまた、例えばエシェリヒアフロインディー(Escherichia freundii)由来のエンド β -ガラクトシダーゼで消化することによっても式(化6)に合致させることができる。なお、解析対象の糖鎖は未標識のものでも標識されているものでもよい。糖鎖は混合物でもよいが好ましくは80%以上の純度であるものがよい。

【0068】各段階で用いるグリコシダーゼは1種でもよいし2種以上のグリコシダーゼの混合物でもよい。用いられるグリコシダーゼは好ましくはエキソグリコシダーゼであるがエンドグリコシダーゼを用いてもよい。反応温度は特に限定はしないが、通常は20℃~50℃で、好ましくは37℃が用いられる。反応時間は特に限定はしないが、通常10分~20時間で、好ましくは3~5時間である。各段階の後に行う反応停止操作は、通常反応液を80~120℃にて3分~10分間処理しグリコシダーゼを失活させることにより行う。こうした失活操作は、場合によっては必要としない。すなわち、次の段階の反応の至適温度や気圧、pH、有機溶媒の濃度等が前の段階のものとは著しく異なり、それ故、前の段階に用いたグリコシダーゼが働きの得ないことが明らかな場合や、あるいは抗体ビーズやイオン交換樹脂等で前の段階に用いたグリコシダーゼを除去した場合などは上述の熱による失活操作は必ずしも必要ではない。反応生成物の分析方法は、薄層クロマトグラフィー、電気泳動、質量分析、ガスクロマトグラフィーなど特に限定はしないが、HPLCによる分析が好ましく用いられる。

【0069】こうした異なる反応系列は一対象につき通常は1~6通り行い、各々の反応生成物を分析し、得られた情報が総合して糖鎖構造を決定する。以下に詳しく説明する。

【0070】(i) GNの結合位置の決定
糖鎖を β -ガラクトシダーゼ、シアリダーゼ、 α -フコシダーゼの混合物で消化すると、Ga1、SA、Fucは糖鎖より除去されるがGNは除去されない。したがって、反応生成物はM3コアにGNのみが結合したものの

いずれかになる。上述の標準物質を用いてこの反応生成物を同定すれば、元の糖鎖のGN結合位置すなわち式(化6)における変数 1_1 、 1_2 、 1_3 、 1_4 が決定できる。なお、ここで用いられるグリコシダーゼは基質特異性の低いものが好ましく、例えば、タチナタマメの β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社)、連鎖球菌の β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社)、アルスロバクターウレアファシエンス(Arthrobacter ureafaciens)由来のシアリダーゼ(ナカライテスク社)、ウシ腎臓の α -フコシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム社)等である。

【0071】(ii) Ga1の結合位置と結合様式の決定
糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、シアリダーゼ、 α -フコシダーゼの混合物で消化すると、Ga1の置換を受けていないGNやFucは糖鎖より除去されるが、Ga1とその還元末端側のGNだけは除去されずに残る。酵素を除去、あるいは失活させた後、糖鎖を更に β -ガラクトシダーゼにて消化しGa1を除去すると、反応生成物はM3コアにGNが結合したもののいずれかになる。前述の標準物質を用いてこの反応生成物を同定すれば、元の糖鎖のGa1結合位置が決定できる。この反応では、Ga1の結合様式までは決定されない。すなわち決定されるのは式(化6)の変数 m_x は m'_x ($X=1, 2, 3, 4$)のどちらかが1であるかどうかであり、いいかえれば($m_x + m'_x$)が0か1かが決定される。なお、ここで用いられるグリコシダーゼは基質特異性の低いものであり、例えば、ウシ腎臓の β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(ベーリンガー・マンハイム社)、タチナタマメの β -ガラクトシダーゼ、連鎖球菌の β -ガラクトシダーゼ、アルスロバクターのシアリダーゼ、ウシ腎臓の α -フコシダーゼ等である。

【0072】Ga1の結合様式を決定するには、結合特異的な β -ガラクトシダーゼを用いて上述と同様の反応を行う。すなわち、糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、シアリダーゼ、 α -フコシダーゼと β -1, 4結合、あるいは β -1, 3結合特異的な β -ガラクトシダーゼの混合物で消化する。Ga1の置換を受けていないGNやFuc、及び結合特異的 β -ガラクトシダーゼによって加水分解されうるGa1とその還元末端側のGNは糖鎖より除去されるが、用いた特異的 β -ガラクトシダーゼで加水分解され得ないGa1とその還元末端側のGNだけは除去されずに残る。酵素を除去、あるいは失活させた後、糖鎖を更に非特異的な β -ガラクトシダーゼにて消化しGa1を除去すると、反応生成物はM3コアにGNが結合したもののいずれかになる。前述の標準物質を用いてこの反応生成物を同定すれば、用いた特異的 β -ガラクトシダーゼによって加水分解され得ないGa1結合位置が決定できる。例えば、 β -1, 4結合特異的な肺炎球菌由来の β -ガラクトシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム社)を用いた場合、この反応によって

$\beta-1$, 3結合したGalの結合位置、すなわち式(化6)における変数 m'_1 , m'_2 , m'_3 , m'_4 が決定できる。先の反応で、 $m_1 + m'_1$, $m_2 + m'_2$, $m_3 + m'_3$, $m_4 + m'_4$ が決定されているので、これらを考え合せると、 $\beta-1$, 4結合したGalの結合位置、すなわち式(化6)における変数 m_1 , m_2 , m_3 , m_4 を決定できる。

【0073】(iii)SAの結合位置と結合様式の決定
糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -フコシダーゼの混合物で消化すると、SAとその還元末端側のGal、GNだけは除去されずに残るがその他のGN、Gal、Fucはすべて除かれる。酵素を除去、あるいは失活させた後、糖鎖を更にシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼの混合物にて消化し、SA、Galを除去すると、M3コアにGNが結合したもののいずれになる。前述の標準物質を用いてこの反応生成物を同定すれば、元の糖鎖のSA結合位置が決定できる。この反応では、SAの結合様式までは決定されない。すなわち決定されるのは式(化6)の変数 n_x と n'_x ($x=1, 2, 3, 4$)のどちらかが1であるかどうかであり、いいかえれば($n_x + n'_x$)が0か1かが決定される。なお、ここで用いられるグリコシダーゼは基質特異性の低いものであり、例えば、ウシ腎臓の β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、タチナタマメの β -ガラクトシダーゼ、連鎖球菌の β -ガラクトシダーゼ、アルスロバクターのシアリダーゼ、ウシ腎臓の α -フコシダーゼ等である。

【0074】SAの結合様式を決定するには、結合特異的なシアリダーゼを用いて上述と同様の反応を行う。すなわち、糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -フコシダーゼと $\alpha-2$, 3結合、あるいは $\alpha-2$, 6結合特異的なシアリダーゼの混合物で消化する。この反応で、用いた特異的なシアリダーゼで加水分解され得ないSAとその還元末端側のGal、GNだけは除去されずに残る。酵素を除去、あるいは失活させた後、糖鎖を更に非特異的なシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼにて消化しSA、Galを除去すると、反応生成物はM3コアにGNが置換したもののいずれになる。前述の標準物質を用いてこの反応生成物を同定すれば、用いた特異的なシアリダーゼによって加水分解され得ないSAの結合位置が決定できる。例えば、 $\alpha-2$, 3結合特異的なサルモネラ菌由来の $\alpha-2$, 3シアリダーゼ(宝酒造社)を用いた場合、この反応によって $\alpha-2$, 6結合したSAの結合位置、すなわち式(化6)における変数 n_1 , n_2 , n_3 , n_4 が決定できる。先の反応で、 $n_1 + n'_1$, $n_2 + n'_2$, $n_3 + n'_3$, $n_4 + n'_4$ が決定されているので、これらを考え合せると、 $\alpha-2$, 3結合したSAの置換位置、すなわち式(化6)における変数 n'_1 , n'_2 , n'_3 , n'_4 を決定できる。

【0075】また、SA以外の構造が既に決定されていて、しかもその構造が比較的簡単である場合には、式(化9)又は(化10)に示されるオリゴ糖標準物質としなくても、以下のようにして構造決定が可能である。例えば、式(化6)において、SA以外の構造が $l_2 = 1$, $l_4 = m_2 = m_4 = 1$ 、残りの変数は0である、いわゆる2本鎖糖鎖であることが、既に決定されている糖鎖のSAの結合位置と結合様式、すなわち、変数 n_2 , n'_2 , n_4 , n'_4 を決定する場合、まず糖鎖を β -ガラクトシダーゼで消化する。次に酵素を除去あるいは失活させた後、糖鎖を更にシアリダーゼにて消化する。この反応で生成しうる糖鎖は($l_2 = 1$, $l_4 = 1$, $m_2 = m_4 = 0$)、($l_2 = 1$, $l_4 = 1$, $m_2 = 0$, $m_4 = 1$)、($l_2 = 1$, $l_4 = 1$, $m_2 = 1$, $m_4 = 0$)、($l_2 = 1$, $l_4 = 1$, $m_2 = m_4 = 1$)の4種がある。SAが結合していたGalは除去されずに残るので、これら4種の糖鎖の標準物質として最終生成物を分離、同定できればSAの結合位置を決定できる。更に前述のように $\alpha-2$, 3結合特異的なシアリダーゼを用いれば、SAの結合様式を決定できる。

【0076】(iv)Fucの結合位置の決定
糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、シアリダーゼの混合物で消化すると、FucとFucによって置換されているGNだけは除去されずに残るがその他のGN、Gal、SAは糖鎖より除去される。酵素を除去、あるいは失活させた後、糖鎖を更に α -フコシダーゼにて消化しFucを除去すると、反応生成物はM3コアにGNが結合したもののいずれになる。前述の標準物質を用いてこの反応生成物を同定すれば、元の糖鎖の $\alpha-1$, 3結合したFucの結合位置、すなわち式(化6)における変数 p_1 , p_2 , p_3 , p_4 が決定できる。なお、ここで用いられるグリコシダーゼは基質特異性の低いものであり、ウシ腎臓の β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、タチナタマメの β -ガラクトシダーゼ、アルスロバクターのシアリダーゼ、ウシ腎臓の α -フコシダーゼ等である。

【0077】糖鎖の還元末端のGNに $\alpha-1$, 6結合したFucの有無すなわち式(化6)における変数 q は $\alpha-1$, 3/4結合特異的な $\alpha-1$, 3/4-フコシダーゼを用いて決定することができる。糖鎖を β -N-アセチルグルコサニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、シアリダーゼと、例えば放線菌由来の $\alpha-1$, 3/4-フコシダーゼ(宝酒造社)の混合物で消化すると、GN、Gal、SA、及び $\alpha-1$, 3結合したFucは除去されるが、 $\alpha-1$, 6結合したFucは除去されないため糖鎖が $\alpha-1$, 6結合したFucをもっていなければ、すなわち $q=0$ ならば、生成物はM3コアとなるのでこれによって $\alpha-1$, 6結合したFucの有無を決定できる。

【0078】また、N-アセチルラクトサミン型糖鎖のFucには式(化6)で表される結合様式のほかに、G

a 1 に $\alpha-1, 2$ で結合するものもまれに存在する。 $\alpha-1, 2$ 結合した F u c の位置は、 $\alpha-1, 2$ 結合特異的なフコシダーゼ、例えばアルスロバクター由来の $\alpha-1, 2$ フコシダーゼ (宝酒造社) を用いた同様の反応によって決定することができる。

【0079】(v) 糖鎖構造の決定

構造解析の対象となる糖鎖が式 (化6) に合致する構造であるならば、上述の (i) ~ (iv) の結果よりその構造を一義的に決めることができる。すなわち、上述

(i) によって GN の結合位置、すなわち式 (化6) における変数 l_1, l_2, l_3, l_4 が決定され、上述

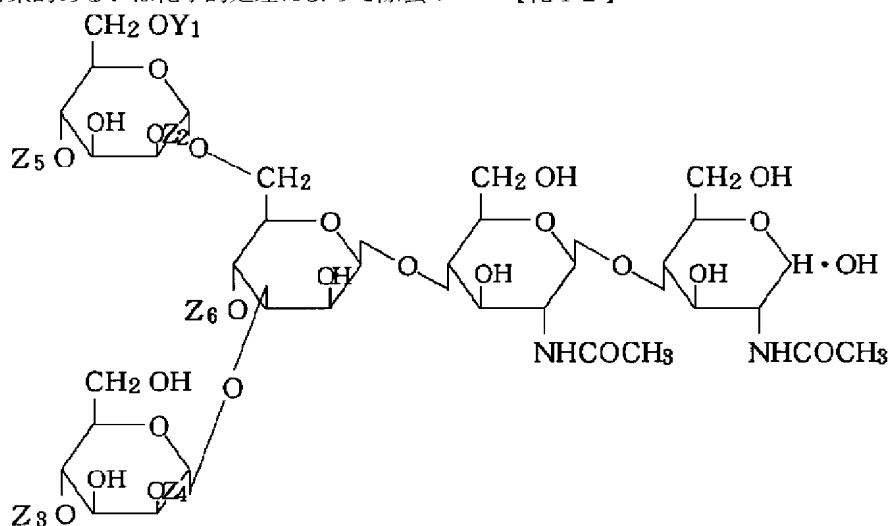
(ii) によって G a 1 の結合位置と結合様式、すなわち式 (化6) における $m_1, m'_1, m_2, m'_2, m_3, m'_3, m_4, m'_4$ が決定され、上述 (iii) によって S A の結合位置と結合様式、すなわち式 (化6) における変数 $n_1, n'_1, n_2, n'_2, n_3, n'_3, n_4, n'_4$ が決定され、上述 (iv) によって F u c の結合位置、すなわち式 (化6) における変数 q, p_1, p_2, p_3, p_4 が決定される。

【0080】また、本発明の方法の別の態様においては、存在を決定すべき特定の糖残基について、該糖残基が存在する枝を酵素的あるいは化学的処理によって除去*

※することにより、該糖残基が存在する枝と存在しない枝を区別する。例えば、ラクト-N-ビオシダーゼは糖鎖の非還元末端の2糖 G a 1 ($\beta 1-3$) GN を切り出す酵素であるが [M. サノ (Sano) ら、プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA、第89巻、第8512~8516頁 (1992)]、この酵素を用いれば、 $\beta-1, 3$ 結合した G a 1 が存在する枝の GN のみを選択的に除去することができる。すなわち、糖鎖をシアリダーゼ、フコシダーゼと、ラクト-N-ビオシダーゼの混合物で処理すると、G a 1 ($\beta 1-3$) GN をもつ枝が選択的に除去される。続いて、糖鎖を β -ガラクトシダーゼで処理すれば、生成物は M3 コアに GN のみが結合したもののうちのいずれかになる。先に述べた GN の結合位置を決定するための反応の生成物には存在していて、ラクト-N-ビオシダーゼを用いた上記反応の生成物には存在しない枝が G a 1 ($\beta 1-3$) GN を含む枝であると決定できる、いいかえれば、 $\beta-1, 3$ 結合した G a 1 が存在する枝を決定できる。なお、本発明の糖鎖構造決定方法は下記式 (化12) :

【0081】

【化12】



【0082】(式中、 $Z_1, Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6$ は、いずれも水素又は β -GN を示す) で表されるオリゴ糖を標準物質とすることにより、更に有用性が拡大する。これは、天然に存在する N-アセチルラクトサミン型糖鎖はその多くが式 (化6) で表されるものであるが、その例外として式 (化12) にて表される構造を※

※その骨格に、G a 1 や S A、F u c が結合したものも存在するからである。特に有用な5種のオリゴ糖を表2に示す。

【0083】

【表2】

表 2

オリゴ糖	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	Z_5	Z_6
XVII :	H	β -GN	H	β -GN	H	β -GN
XVIII :	H	β -GN	β -GN	β -GN	H	β -GN

29						30
X I X	:	β -GN	β -GN	H	β -GN	H β -GN
XX	:	β -GN	β -GN	β -GN	β -GN	H β -GN
XX I	:	β -GN	β -GN	β -GN	β -GN	β -GN β -GN

【0084】これらのオリゴ糖もオリゴ糖I～XIVと同様に、未標識のままあるいは標識して用いることができる。なお、本発明の方法においては、処理後の生成物を標準物質と比較することにより同定するのが代表的な態様であるが、他の方法、例えばNMR等によって生成物の構造を決定することができるならば、それらの方法によってもよい。

【0085】本発明の方法に用いる試薬類をまとめてキット化しておくことにより、糖鎖構造の決定を更に簡便に行うことができる。キットは式(化4)で表されるオリゴ糖の少なくとも1種を含有しておればよいが、式

(化9)又は式(化10)で表される他のオリゴ糖を含有してもよい。例えば、I-PA～VIII-PAを含有するキットは、N-アセチルラクトサミン型糖鎖のうち、式(化6)において、 $1_1 = 1$ 、 $1_2 = 0$ 、 $1_3 = 1$ 、 $1_4 = 1$ である2本鎖、又は式(化6)において、 $1_1 = 0$ 、 $1_2 = 1$ 、 $1_3 = 1$ 、 $1_4 = 1$ である3本鎖の糖鎖の分析に特に有用であり、例えばI-PA～XVI-PAを含有するキットは広くN-アセチルラクトサミン型糖鎖の分析に有用である。また、キット中にはオリゴ糖のほかグリコシダーゼ、分析用のカラム、緩衝液等を含有していてもよい。なお、キットに含まれる試薬類は溶液状でもよく、凍結乾燥物でもよい。

【0086】

【実施例】以下、実施例をもって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0087】実施例1

市販のオリゴ糖VIII-PA (PA-シュガーチェーン013、宝酒造社) 200nmolを50mMリン酸-クエン酸緩衝液(pH5.0)中では肺炎球菌由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(ベーリンガー社) 20mUで37℃にて消化した。反応液の一部をHPLCにて分析し、未分解物が全体の約25%になった時点で反応液を100℃で5分処理して反応を停止させた。次に該反応液をHPLCに供し、I-PA(22.4分)、II-PA(42.5分)、III-PA(25.2分)を分取、精製した。なお、HPLCの条件は下記によった。

【0088】装置： LC6A型(島津製作所)

カラム： バルバックタイプR(4.6mm ϕ ×250mm)(宝酒造社)

溶離液： 0.035%1-ブタノールを含む100mM酢酸-トリエチルアミン(pH4.0)

検出： 蛍光検出器RF-535(島津製作所)にて励

起波長320nm、蛍光波長400nmで検出

流速： 1ml/分

カラム温度： 40℃

(以下条件1と称す)

【0089】次に精製した3種のオリゴ糖I-PA、II-PA、III-PAをAPI-III質量分析器(パーキンエルマー・サイエンス社)を用いた質量分析、400MHzプロトン核磁気共鳴装置(ブルッカー社)によるNMRスペクトル分析(重水中)、及び酸加水分解による糖組成分析に供した。

【0090】各オリゴ糖の物性を以下に示す。更に、図8及び図9にI-PAの、図10及び図11にII-PAの、図12及び図13にIII-PAの¹H-NMRスペクトルを示す。なお、¹H-NMRでの化学シフト値は、テトラメチルシランを基準としたときの37℃、重水中でのアセトンのメチルプロトンの化学シフト値を2.218ppmとして表した。図9、図11、図13において2.218ppmに見られるシグナルは、内部基準に用いたアセトンのメチルプロトンのシグナルである。

【0091】(I-PAの物性)

分子量 1192.7

¹H-NMR 4.556(H-1、GN-7)、

2.067(NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:2.5、GalとFucは無し。

【0092】(II-PAの物性)

分子量 1395.4

¹H-NMR 4.541(H-1、GN-5')、

4.556(H-1、GN-7)、2.040(NAc、GN-5')、

2.066(NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0093】(III-PAの物性)

分子量 1395.5

¹H-NMR 4.527(H-1、GN-5)、

4.515(H-1、GN-7)、2.045(NAc、GN-5)、

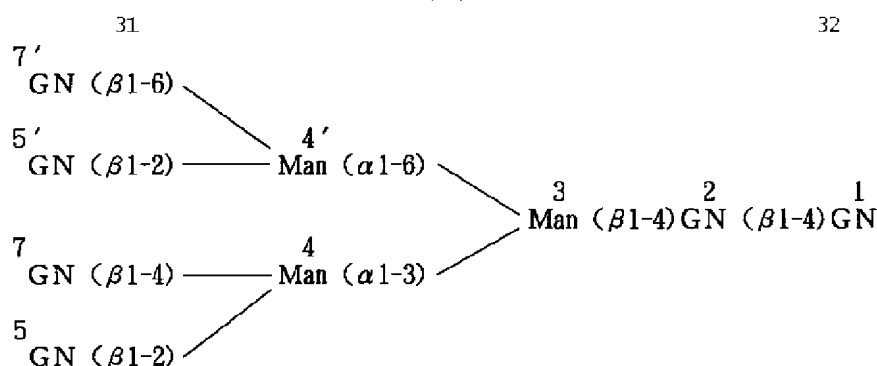
2.067(NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0094】なお、¹H-NMRにおける糖残基の番号は下記式(化11)のとおりである。

【0095】

【化11】



【0096】実施例2

(1) I-PA～VIII-PAの分離

実施例1で得たI-PA、II-PA、III-PAと、市販のIV-PA (PA-シュガーチェーン016、寶酒造社)、V-PA (PA化標準糖鎖100、1、中埜酢店社)、VI-PA (PA化標準糖鎖100、2、中埜酢店社)、VII-PA (PA-シュガーチェーン012、寶酒造社)、VIII-PA (PA-シュガーチェーン013、寶酒造社)を各1 μ molを含む混合液を条件1にてHPLCに供した(図1)。8種のPA化オリゴ糖が分離された。

【0097】(2) I-PA～XVI-PAの分離

XVI-PA (PA-シュガーチェーン014、宝酒造社) 1 nmolを50 mMリン酸-クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中で、比較的特異性のないウシ腎臓由来 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ベーリンガー社) 1 mUで37℃にて消化した。反応液の一部をバルバックタイプNを用いたHPLC〔溶離液: 50 mM酢酸-トリエチルアミン (pH 7.3) 中、アセトニトリル70% (0分) → 50% (300分) のリニアグラジエント、その他は条件1と同じ (以下、条件2と称する)〕で分析し、未分解物が全体の約20%になったところで反応液を100℃で5分間処理して反応を停止させ、I-PA～XVI-PAの混合物を調製した。該混合物を条件2によるHPLCに供した。そのチャートを図2に示す。13～17分に溶出するフラクション1、18～23分に溶出するフラクション2、24分～29分に溶出するフラクション3、32分～38分に溶出するフラクション4、42分～46分に溶出するフラクション5の画分に分画した。条件2は糖鎖をその糖残基の数によって分離することができ、市販のIV-PA、V-PA、VII-PA、VIII-PA、XVI-PAの条件2のHPLCによる溶出位置との比較により、フラクション1の15.4分のピークはM3コアにGNが全く結合していないもの、すなわちIV-PAと同定された。同様にして、フラクション2はM3コアにGNが1個結合しているもの、すなわち、I-PA、V-PA、VI-PA、XII-PAの4種の混合物と同定され、フラクション3はM3コアにGNが2個結合したものの、すなわちII-PA、II

I-PA、VII-PA、IX-PA、XIII-PA、XIV-PAの6種の混合物と同定され、フラクション4はM3コアにGNが3個結合したものの、すなわちVIII-PA、X-PA、XI-PA、XV-PAの4種の混合物と同定され、フラクション5の44.0分のピークはM3コアにGNが4個結合したものの、すなわちXVI-PAと同定された。

【0098】フラクション1の15.4分のピーク (IV-PA) 及びフラクション5の44.0分のピーク (XVI-PA) は、バルバックタイプRを用いたHPLC〔溶離液: 0.07% 1-ブタノールを含む酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0)、その他は条件1と同じ (以下、条件3と称す)〕に供した場合でもそれぞれ12.0分、15.7分の単一ピークを示した。

【0099】フラクション2を、条件3のHPLCに供すると、VI-PAが11.2分に、XII-PAが12.8分に、I-PAが15.2分に、V-PAが20.7分に溶出された。このパターンを図3に示す。フラクション3を条件1のHPLCに供すると、XIII-PAが15.0分に、IX-PAが16.8分に、III-PAが25.2分に、XIV-PAが25.9分に、VII-PAが26.7分に、II-PAが42.5分に溶出された。このパターンを図5に示す。フラクション4を、条件3のHPLCに供すると、XV-PAが10.4分に、X-PAが13.3分に、XI-PAが17.6分に、VIII-PAが25.9分に溶出された。このパターンを図4に示す。以上のようにして、I-PA～XVI-PAの16種のPA化オリゴ糖を分離することができた。

【0100】なお、各ピークの同定は以下のようにして行った。まず実施例1で得られたI-PA、II-PA、III-PA、及び市販のIV-PA、V-PA、VI-PA、VII-PA、VIII-PA、XVI-PAを標準物質とし、そのピークの溶出位置を比較することにより、図2の15.4分のピークをIV-PAと、図2の44.0分のピークをXVI-PAと、図3の11.2分のピークをVI-PAと、図3の15.2分のピークをI-PAと、図3の20.7分のピークをV-PAと、図4の25.9分のピークをVIII-PAと、図5の25.2分のピークをIII-PAと、図5の26.7分のピークをVII-

PAと、図5の42.5分のピークをII-PAと同定した。また、図3の12.8分のピークに関しては、分取した後にウシ腎臓由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼで処理するとM3コアになること、出発物質がXVI-PAであること、及び他の3種が別の位置に溶出することからXII-PAと同定した。

【0101】残り6種のピークに関しては、それぞれを分取して以下の方法で同定した。なお、図5の25.9分のピークについては、フラクション3の一部を β -1,2結合特異的な肺炎球菌由来 β -N-アセチルグルコサミニダーゼで完全消化して条件1のHPLCに供すると25.2分(III-PA)と26.7分(VII-PA)のピークが消失し(加水分解されてそれぞれI-PA、IV-PAが生成する。)25.9分のピークのみが加水分解されずに残るので(図6)、この25.9分のピークを分取した。

【0102】分取したそれぞれのピークをウシ腎臓由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼで部分消化し、条件2のHPLCに供し、M3コアにGNが1個結合した画分を分取した。次に、分取した画分を条件3のHPLCに供し分析した。その結果、図4の10.5分のピークからV-PA、VI-PA、及びXII-PAが検出されたので、該ピークをXV-PAと同定した。同様に、図4の13.3分のピークからI-PA、V-PA、及びXII-PAが検出されたので、該ピークをX-PAと同定した。同様に、図4の17.6分のピークからI-PA、VI-PA、及びXII-PAが検出され、該ピークをXI-PAと同定した。同様に、図5の15.0分のピークからV-PA及びXII-PAが検出されたので、該ピークをXIII-PAと同定した。同様に、図5の16.8分のピークからVI-PA及びXII-PAが検出されたので、該ピークをIX-PAと同定した。同様に、図6の25.9分のピークからI-PA及びXII-PAが検出されたので、該ピークをXIV-PAと同定した。

【0103】実施例3

(1)4本鎖アシアロ糖鎖のPA化物XVI-PA(PA-シュガーチェーン004、宝酒造社製)850nmolに、2.5 μ molのCMP-シアル酸(シチジン5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸、CMP-NANA、シグマ社)を加え、0.5%トリトンCF-54含有の12.5mMカコジル酸緩衝液(pH6.8)中で、0.1Uのラット肝臓由来の2,6シアルルトランスフェラーゼ(ベーリンガー・マンハイム社)と37℃にて36時間反応させた。途中、16時間、24時間の時点で、反応液にCMP-NANAを2.5 μ molずつ添加した。次に、反応液を、セファデックスG-15カラムにかけて脱塩したのち、糖鎖画分をモノQカラム(ファルマシア社)にかけて、10mMから100mMの酢酸アンモニウム(pH8.5)のグラジエントで溶出した。溶出画分のうち、糖鎖1mol当り3mol

1のシアル酸を含む画分を回収した。回収したシアル糖鎖は646nmolであった。回収したシアル糖鎖500nmolを50mMリン酸緩衝液(pH7)中で、4.7mUの牛肝臓由来カタラーゼ(シグマ社)の存在下、100Uのダクチリウム・デンドロイデス(*Dactylium dendroides*)由来のガラクトースオキシダーゼ(宝酒造社)にて37℃、2時間反応させた。反応液を、沸騰水浴中で10分間処理し、次いで1Uのシアリダーゼ(アルスロバクター・ウレアファシエンス由来、極東製薬社)を加え、37℃にて2時間消化し、更に250Uの β -ガラクトシダーゼ(麴カビ由来、東洋紡社)を加え、37℃で5.5時間反応を続けた。次に、5Nの水酸化ナトリウムにて反応液のpHを約11にしたのち、20mgの水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4)を加え、室温で30分間放置した。更に30mgの水素化ホウ素ナトリウムを加え、室温で30分放置し還元反応を完了させた。還元反応液をセファデックスG-15カラムにかけて脱塩をしたのち、バルバックタイプRカラムにかけた。溶出は0.1%ブタノール、0.05%トリフルオロ酢酸にて行い、30分に溶出するメインピークを回収した。得られた糖鎖は、XVI-PAの α -Manに β -1,6結合したGNがGalによって保護されているものであり、回収量は300nmolであった。

【0104】得られた保護糖鎖のうち250nmolを50mMクエン酸緩衝液(pH5)、50mM D-(+)-ガラクトノ-1,4-ラクトン[D-(+)-galactono-1,4-lactone、ナカライテスク社]中、2.5Uの牛腎臓由来N-アセチルグルコサミニダーゼ(ベーリンガー社)で消化した。3.5時間反応させた後、反応液を沸騰水浴中で10分間処理し反応を停止した。反応液をセファデックスG-15カラムにかけ、脱塩したのち、下記条件HPLCにて、M3コアに結合しているGNの数によって、画分A(GNが1つ結合している)、画分B(GNが2つ結合している)、画分C(GNが3つ結合している)を得た。HPLCのパターンを図21に示す。

【0105】HPLC条件

装置: LC6A型(島津製作所)

カラム: アサヒパック(Asahi PAK)NH2P-50(6mm ϕ ×150mm)(旭化成社)

溶離液A: 75%アセトニトリル含有50mM酢酸-トリエチルアミン(pH7.3)

溶離液B: 50%アセトニトリル含有50mM酢酸-トリエチルアミン(pH7.3)

溶出: 100分でB液を10%から25%に上げるグラジエント溶出

検出: 蛍光検出器RF-535(島津製作所)にて励起波長315nm、蛍光波長380nmで検出

流速: 1ml/分

カラム温度: 40℃

【0106】それぞれの画分を7.5Uの麹カビ由来のβ-ガラクトシダーゼ(東洋紡社)にて37℃で15時間消化した。沸騰水浴中で10分間処理し、反応を停止したのち、下記条件HPLCにて、画分Aの反応物からXII-PA(23.6分)を、画分Bの反応物からXII-PA(19.4分)、IX-PA(21.4分)、XIV-PA(31.3分)を、画分Cの反応物からXV-PA(18.9分)、X-PA(25.4分)、XI-PA(33.4分)をそれぞれ分取した。

【0107】

【0108】次に、精製したオリゴ糖のうち、IX-PA、X-PA、XI-PA、XII-PA、XIII-PA、XIV-PAをAPI-III質量分析器(パーキンエルマー・サイエクス社)を用いた質量分析、500MHzプロトン核磁気共鳴装置(日本電子社)(X-PAのみ前出のブルッカー社)によるNMRスペクトル分析(重水中)、及び酸加水分解による糖組成分析に供した。

【0109】各オリゴ糖の物性を以下に示す。更に、図14にIX-PAの、図15及び図16にX-PAの、図17にXI-PAの、図18にXII-PAの、図19にXIII-PAの、図20にXIV-PAのプロトン核磁気共鳴(¹H-NMR)のスペクトルを示す。なお、実施例1と同様に、¹H-NMRでの化学シフト値は、テトラメチルシランを基準としたときの37℃、重水中でのアセトンのメチルプロトンの化学シフト値を2.218ppmとして表した。図14、15、17~20において2.218ppmに見られるシグナルは、内部基準に用いたアセトンのメチルプロトンのシグナルである。また、¹H-NMRにおける糖残基の番号は式(化11)のとおりである。

【0110】(IX-PAの物性)

分子量 1395.0(質量分析による)

¹H-NMR 4.552(H-1、GN-7')、4.535(H-1、GN-5)、2.046(NAc、GN-7')、2.046(NAc、GN-5)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0111】(X-PAの物性)

分子量 1599.0(質量分析による)

¹H-NMR 4.528(H-1、GN-7')、4.549(H-1、GN-5')、4.557(H-1、GN-7)、2.028(NAc、GN-7')、2.038(NAc、GN-5')、2.067(NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:4.5、GalとFucは無し。

【0112】(XI-PAの物性)

分子量 1598.0(質量分析による)

¹H-NMR 4.546(H-1、GN-7')、4.515(H-1、GN-7)、4.529(H-1、GN-5)、2.045(NAc、GN-7')、2.065(NAc、GN-7)、2.045(NAc、GN-5)

糖組成 Man:GN=3.0:4.5、GalとFucは無し。

【0113】(XII-PAの物性)

分子量 1191.5(質量分析による)

¹H-NMR 4.542(H-1、GN-7')、2.043(NAc、GN-7')

糖組成 Man:GN=3.0:2.5、GalとFucは無し。

【0114】(XIII-PAの物性)

分子量 1395.0(質量分析による)

¹H-NMR 4.530(H-1、GN-7')、4.548(H-1、GN-5')、2.027(NAc、GN-7')、2.038(NAc、GN-5')

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0115】(XIV-PAの物性)

分子量 1395.0(質量分析による)

¹H-NMR 4.545(H-1、GN-7')、4.556(H-1、GN-7)、2.043(NAc、GN-7')、2.065(NAc、GN-7)

糖組成 Man:GN=3.0:3.5、GalとFucは無し。

【0116】(2)I-PA~XVI-PAの2次元マップ

I-PA~XVI-PAの16種のオリゴ糖を各500fmolずつ含むサンプルを条件2及びバルバックタイプRを用いたHPLC〔溶離液:0.02%1-ブタノールを含む100mM酢酸トリエチルアミン(pH4.0)、その他は条件1と同じ(以下、条件4と称す)〕に供し、それぞれの条件でのオリゴ糖の溶出パターンとそれぞれの溶出位置を2次元的にプロットした2次元マップを作成した。図7にその図を示す。図中、縦軸は条件4によるHPLCのチャートと溶出時間を示し、横軸は条件2によるHPLCのチャートと溶出時間を示し、黒丸はそれぞれのオリゴ糖の溶出位置を示す。

【0117】実施例4

N-アセチルラクタサミン型糖鎖の構造決定を行うためのキット1及びキット2を作製した(表3、表4)。なお、キットに含有されたオリゴ糖IV-PA、及びVII-PA、VIII-PA、XVI-PAは前出の寶酒造社製のものを用いた。オリゴ糖V-PA及びVI-PAは前出の中塾酢店製のものを用いた。オリゴ糖IX-PA~XV-PAは実施例3に記載の方法、又はオリゴ糖XVI-PAをウシ腎臓由来のN-アセチルグルコサミニダーゼによって部分加水分解したものより実施例2-(2)に記載の

方法でHPLCにて精製した。

【0118】

＊【表3】

＊

表 3 キット1の内容(100回分)
試 薬

	内容量 (ml)
1液：オリゴ糖 I-P A～VIII-P Aの混合溶液 (各1 pmol/ μ l)	0.1
2液：250 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0)	0.4
3液：50 U/ml アルスロバクター ウレアファシエンス 由来シアリダーゼ	0.5
4液：15 U/ml サルモネラ菌由来 α -2,3シアリダーゼ	0.5
5液：5 U/ml 肺炎球菌由来 β -ガラクトシダーゼ	0.5
6液：5 U/ml 直鎖球菌由来 β -ガラクトシダーゼ	0.5
7液：100 U/ml ウシ腎臓由来 β -N-アセチル グルコサミニダーゼ	0.5
8液：10 U/ml ウシ腎臓由来 α -フコシダーゼ	0.5
9液：1 U/ml 放線菌由来 α -1,3/4フコシダーゼ	0.5
10液：0.035% 1-ブタノール含有100 mM酢酸-トリエチル アミン (pH 4.0)	1000

【0119】

付 属 品	内容量
カラム1：バルバックタイプR (寶酒造製) (4.6 mm ϕ ×250 mm)	1本

【0120】

※ ※【表4】

表 4 キット2の内容(100回分)
試 薬

	内容量 (ml)
1液：オリゴ糖 I-P A～XVI-P Aの混合溶液 (各1 pmol/ μ l)	0.1
2液：250 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0)	0.4
3液：50 U/ml アルスロバクター ウレアファシエンス 由来シアリダーゼ	0.5
4液：15 U/ml サルモネラ菌由来 α -2,3シアリダーゼ	0.5
5液：5 U/ml 肺炎球菌由来 β -ガラクトシダーゼ	0.5
6液：5 U/ml 直鎖球菌由来 β -ガラクトシダーゼ	0.5
7液：100 U/ml ウシ腎臓由来 β -N-アセチル グルコサミニダーゼ	0.5
8液：10 U/ml ウシ腎臓由来 α -フコシダーゼ	0.5
9液：1 U/ml 放線菌由来 α -1,3/4フコシダーゼ	0.5
10液：0.035% 1-ブタノール含有100 mM酢酸-トリエチル アミン (pH 4.0)	1000
11液：0.07% 1-ブタノール含有100 mM酢酸-トリエチル アミン (pH 4.0)	1000
12-A液：75% アセトニトリル含有50 mM酢酸-トリエチル アミン (pH 7.3)	1000
12-B液：50% アセトニトリル含有50 mM酢酸-トリエチル	1000

【0121】

付 属 品	内 容 量
カラム1：バルパックタイプR (4.6mmφ×250mm)	1本
カラム2：バルパックタイプN (4.6mmφ×250mm)	1本

【0122】実施例5

ウシフェツインは分子量約48000の糖タンパク質でその重量の約22%が糖鎖で構成されている。フェツインの糖鎖の構造は従来より詳細に解析されており糖タンパク質糖鎖の研究には格好の材料である。フェツインの主要なアスパラギン結合型糖鎖の構造は、表5のXXIIとXXIIIに示されるものにSAが0～5個結合した構造をしている。SAの結合している数、位置、結合様式により、フェツインの糖鎖は非常に多様な構造を有しているがその多くが式(化6)で表される構造であるため本発明のキットを用いて解析が可能であった。

【0123】(1)ウシフェツイン糖鎖の調製

ウシフェツイン(寶酒造社)1gをヒドラジン分解、N-アセチル化し、遊離の糖鎖画分を得た。得られた糖鎖画分をPA化し、セファデックスG15カラム(ファルマシア社)にて余剰の試薬等を除去し、PA化糖鎖を得た。該PA化糖鎖を10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラム(18mmφ×250mm、東ソー社)に供し、NaClの塩濃度0～100mMのグラジエントで溶出した。これにより、PA化糖鎖は1分子にSAが0～4個結合した5つの画分に分離された。このうち、SAが1個結合した画分を2個結合した画分を分取し、その1/100量をそれぞれ逆相カラムコスモシル(Cosmosil)5C₁₈AR(4.6mmφ×250mm、ナカライテスク社)を用いたHPLC〔溶離液：0.15%1-ブタノール含有50mM酢酸-トリエチルアミン(pH5.0)〕に供した。SAが1個結合している画分から40分のピークを、SAが2個結合した画分から38分、48分、72分のピークを分取し、更にアサヒバックNH₂P50を用いたHPLCによって精製した。SAが2個で48分の画分の糖鎖をA、SAが2個で38分の画分の糖鎖をB、SAが1個で40分の画分の糖鎖をC、SAが2個で72分の画分の糖鎖をDと命名した。各糖鎖を蒸留水100μlに溶かし、サンプルとした。

【0124】(2)Aの糖鎖構造決定

実施例4のキット1を用いて以下の操作を行った。

(反応1) サンプル5μlに2液4μl、3液4μl、5液4μlと蒸留水3μlを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2μlを条件1のHPLCにて分析した。

10 (反応2) サンプル5μlに2液4μl、5液4μl、7液4μlと蒸留水3μlを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2μl、5液を2μl添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2μlを同様にHPLCにて分析した。

(反応3) サンプル5μlに2液4μl、4液4μl、5液4μl、7液4μlを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2μl、5液を2μl添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2μlを同様にHPLCにて分析した。

【0125】結果：反応1の反応液を分析すると、生成物はその溶出時間よりVIII-PAであった。糖鎖AのGalはβ-1, 4結合特異的なβ-ガラクトシダーゼすなわち反応1で用いた5液によってすべて除去されたことになる。つまり糖鎖AのGalの結合はすべてβ-1, 4であった。したがって糖鎖Aは式(化6)において $l_1 = m_1 = m'_1 = m'_2 = m'_3 = m'_4 = q = p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = 0$ 、 $l_2 = l_3 = l_4 = m_2 = m_3 = m_4 = 1$ と決定された。次に、反応2の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりIII-PAであった。したがって、糖鎖Aは表5のXXIIのPA化物(XXII-PA)のα-1, 3結合で分岐したManの側の2つのGalにSAを有している。すなわち式(化6)において、 $n_1 = n_2 = n'_1 = n'_2 = 0$ 、 $n_3 + n'_3 = n_4 + n'_4 = 1$ と決定された。次に、反応3の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりVI-PAが約80%でIII-PAが約20%であった。したがって、糖鎖AはXXII-PAのα-1, 3結合で分岐しているManの側の2個のGalの両方にα-2, 6結合したSAを有しているもの、すなわち $n_3 = 1$ 、 $n_4 = 1$ であるものが約20%でGN(β1-2)Man(α1-3)のGNに結合しているGalにα-2, 6結合したSAを有しているもの、すなわち $n_3 = 0$ 、 $n_4 = 1$ であるものが約80%であると決定された。これらを結合すると、Aは表5のXXIVに示す構造のもののPA化物と、XXVで表される構造のもののPA化物とが約4対1の比である混合物と決定された。

【0126】(3)Bの糖鎖構造決定

50 実施例4のキット1を用いて以下の操作を行った。

(反応1) サンプル5 μ lに2液4 μ l、3液4 μ l、5液4 μ lと蒸留水3 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを(2)と同様にHPLCにて分析した。

(反応2) サンプル5 μ lに2液4 μ l、5液4 μ l、7液4 μ lと蒸留水3 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2 μ l、5液を2 μ l添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを同様にHPLCにて分析した。

(反応3) サンプル5 μ lに2液4 μ l、4液4 μ l、5液4 μ l、7液4 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2 μ l、5液を2 μ l添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを同様にHPLCにて分析した。

【0127】結果：反応1の反応液を分析すると、生成物はその溶出時間よりVII-PAであった。したがって糖鎖Bは式(化6)において $l_1 = l_3 = m_1 = m_3 = m'_1 = m'_3 = q = p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = 0$ 、 $l_2 = l_4 = m_2 = m_4 = 1$ であると決定された。次に、反応2の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりVII-PAであった。したがって、糖鎖Bは表5のXXIIIのPA化物(XXIII-PA)の両方のGalにSAを有している。すなわち式(化6)において $n_2 + n'_2 = n_4 + n'_4 = 1$ であると決定された。次に、反応3の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりVI-PAであった。したがって、糖鎖BはXXIII-PAの2個のGalのうち $\alpha-1$ 、3結合で分岐しているManの側のGalに $\alpha-2$ 、6結合したSAを有している、すなわち $n_2 = 0$ 、 $n_4 = 1$ と決定された。これらを結合すると、Bは表5のXXVIに示す構造の糖鎖のPA化物であると決定された。

【0128】(4)Cの糖鎖構造決定

実施例4のキット1を用いて以下の操作を行った。

(反応1) サンプル5 μ lに2液4 μ l、3液4 μ l、5液4 μ lと蒸留水3 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを(2)と同様にHPLCにて分析した。

(反応2) サンプル5 μ lに2液4 μ l、5液4 μ l、7液4 μ lと蒸留水3 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2 μ l、5液を2 μ l添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを同様にHPLCにて分析した。

(反応3) サンプル5 μ lに2液4 μ l、4液4 μ l、5液4 μ l、7液4 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2 μ l、5液を2 μ l添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを同

様にHPLCにて分析した。

【0129】結果：反応1の反応液を分析すると、生成物はその溶出時間よりVIII-PAであった。したがって糖鎖Cは式(化6)において $l_1 = m_1 = m'_1 = m'_2 = m'_3 = m'_4 = q = p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = 0$ 、 $l_2 = l_3 = l_4 = m_2 = m_3 = m_4 = 1$ と決定された。次に、反応2の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりI-PA約50%とV-PAが約50%であった。したがって、糖鎖CはXXII-PAのGN($\beta 1-4$)Man($\alpha 1-3$)のGNに結合しているGalにSAが置換したもの、すなわち式(化6)において $n_2 = n_4 = n'_2 = n'_4 = 0$ 、 $n_3 + n'_3 = 1$ であるものと、GN($\beta 1-2$)Man($\alpha 1-6$)のGNに結合しているGalにSAが結合しているもの、すなわち式(化6)において $n_3 = n_4 = n'_3 = n'_4 = 0$ 、 $n_2 + n'_2 = 1$ であるものとのほぼ1対1の混合物であると決定された。次に、反応3の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりIV-PAであった。したがって、糖鎖Cは2、6結合したSAを有しておらず、したがって、糖鎖CのSAはすべて $\alpha-2$ 、3結合で置換している、すなわち式(化6)において、 $n'_2 = 1$ あるいは $n'_3 = 1$ であると決定された。これらを総合すると、精製糖鎖Cは表5のXXVIIに示す構造のもののPA化物と、XXVIIIで表される構造のもののPA化物とのほぼ1対1の混合物であると決定できた。

【0130】(5)Dの糖鎖構造決定

実施例4のキット1を用いて以下の操作を行った。

(反応1) サンプル5 μ lに2液4 μ l、3液4 μ l、5液4 μ lと蒸留水3 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを(2)と同様にHPLCにて分析した。

(反応2) サンプル5 μ lに2液4 μ l、5液4 μ l、7液4 μ lと蒸留水3 μ lを加え、37℃にて5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、3液を2 μ l、5液を2 μ l添加し更に5時間反応させた。反応液を100℃で10分処理した後、2 μ lを同様にHPLCにて分析した。

【0131】結果：反応1の反応液を分析すると、生成物はその溶出時間よりVIII-PAであった。したがって糖鎖Dは式(化6)において $l_1 = m_1 = m'_1 = m'_2 = m'_3 = m'_4 = q = p_1 = p_2 = p_3 = p_4 = 0$ 、 $l_2 = l_3 = l_4 = m_2 = m_3 = m_4 = 1$ と決定された。次に、反応2の反応液を分析したところ、生成物はその溶出時間よりII-PAであった。したがって、DはXXII-PAの $\alpha-1$ 、3結合で分岐したManに $\beta-1$ 、2置換したGNに結合しているGalと、 $\alpha-1$ 、6結合で分岐したManに $\beta-1$ 、2置換しているGNに結合しているGalはにSAを有している、すなわち式(化6)において $n_2 + n'_2 = n_3 + n'_3 = 1$ で

あると決定された。したがってDは表5のXXIXの構造の糖鎖のPA化合物であると決定された。なお、オリゴ糖XXII~XXIXは式(化6)において変数 l_x 、 m_x 、 m'_x 、 n_x 、 n'_x 、 q 、 p_x ($x=1, 2, 3$)、*

*4) について下表の条件を満たすものである。

【0132】

【表5】

表5 ウシフェツイン由来のオリゴ糖

オリゴ糖	変 数																								
	l_1	m_1	m'_1	n_1	n'_1	l_2	m_2	m'_2	n_2	n'_2	l_3	m_3	m'_3	n_3	n'_3	l_4	m_4	m'_4	n_4	n'_4	q	p_1	p_2	p_3	p_4
XXII	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XIII	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XXIV	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
XXV	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
XXVI	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
XXVII	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XXVIII	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
XXIX	0	0	0	0	0	1	1	0	(1)		1	1	0	(1)		1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

【0133】(1)は2つの変数のうちどちらか一方が1でもう一方が0であることを示す。

【0134】実施例6

α_1 -アシッドグリコプロテインの糖鎖構造決定

α_1 -アシッドグリコプロテイン(シグマ社)1mgをヒドラジン分解、N-アセチル化し、遊離の糖鎖画分を得た。得られた糖鎖画分を、0.1N塩酸で1時間処理し、SAを除去した。処理した糖鎖画分を、バイオゲルP-4(バイオラッド社)カラム(25mm ϕ ×90cm×2本)にインジェクトし、水にて溶出した。重合度が21のイソマルトオリゴ糖とほぼ同じ時間に溶出するピークを分取し、凍結乾燥後PA化した。更に、PA化したオリゴ糖をバルパックタイプRを用いたHPLCにて精製し、糖鎖Eを得た。糖鎖Eの50pmolを5mUのエシェリヒア フロインディー由来のエンド- β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社)で37℃にて2時間処理した。生成物の一部を、アナリティカル バイオケミストリー、第171巻、第73~90頁(1988)に記載のアミドシリカ(東ソー社)を用いたHPLCにて分析したところ、糖鎖Eよりも約2.5グルコースユニット相当早く溶出した。該生成物を糖鎖Fと命名した。この結果より、糖鎖Eは式(化6)において、 $m_1 = m_2 = m_3 = m_4 = l_1 = l_2 = l_3 = l_4 = 1$ 、残りの変数は0のいわゆる4本鎖糖鎖の枝のいずれかに、N-アセチルラクトサミン[-Gal(β 1-4)GN(β 1-3)-]が付加したものであり、エンド- β -ガラクトシダーゼによって3糖Gal(β 1-4)GN(β 1-3)Galが遊離し、糖鎖Fになったものと推定された。

【0135】続いて、N-アセチルラクトサミンの付加

した枝を実施例4のキット2を用いて決定した。

(反応1) 糖鎖F、5 μ l(10pmol)に、2液4 μ l、5液2 μ lと蒸留水9 μ lを加え、37℃にて2時間反応させた。反応液を100℃で10分間処理した後、2 μ lずつを、条件2と条件4によるHPLCにて分析した。

(反応2) 糖鎖F、5 μ l(10pmol)に、2液4 μ l、7液4 μ lと蒸留水7 μ lを加え、37℃にて2時間反応させた。反応液を100℃で10分間処理した後、5液を2 μ l添加し、更に2時間反応させた。反応液を100℃で10分間処理した後、2 μ lずつを条件2と条件4によるHPLCにて分析した。

【0136】(結果) 反応1の生成物は、2次元マップにより標準物質I-PA~XVI-PAと比較、同定したところ、XVI-PAと同定された。したがって、糖鎖Fは、式(化6)において、 $l_1 = l_2 = l_3 = l_4 = 1$ であると決定された。同様に、反応2の生成物は、2次元マップによりXI-PAと同定された。したがって、糖鎖Fは、式(化6)において、 $m_1 = m_3 = m_4 = 1$ 、 $m_2 = 0$ であると決定された。以上より、糖鎖Fは、式(化6)において、 $l_1 = l_2 = l_3 = l_4 = m_1 = m_3 = m_4 = 1$ 、他の変数はすべて0であると決定された。また、この結果より、糖鎖Fでは、N-アセチルラクトサミンは、 α -1, 6で結合したManに β -1, 2結合したGNへ β 1-4で結合しているGalに付加したものと決定された。

【0137】

【発明の効果】本発明により、より正確で簡便なN-アセチルラクトサミン型糖鎖の糖鎖構造決定方法、該方法に用いるためのキット、及び標準物質として有用な新規

オリゴ糖が提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】8種のオリゴ糖I-PA~VIII-PAの混合物を条件1のHPLCに供したときのチャートを示す図である。

【図2】16種のオリゴ糖I-PA~XVI-PAの混合物を条件2のHPLCに供したときのチャートを示す図である。

【図3】図2のフラクション2を条件3のHPLCに供したときのチャートを示す図である。

【図4】図2のフラクション4を条件3のHPLCに供したときのチャートを示す図である。

【図5】図2のフラクション3を条件1のHPLCに供したときのチャートを示す図である。

【図6】図2のフラクションを肺炎球菌由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼにて完全消化したものを条件1のHPLCに供したときのチャートを示す図である。

【図7】16種のオリゴ糖I-PA~XVI-PAの混合物を条件2と条件4のHPLCに供したときのチャート、及び16種のオリゴ糖の2次元マップを示す図である。

【図8】I-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が3.00ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図9】I-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.85ppmから2.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図10】II-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が3.00ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図11】II-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.85ppmから2.50ppmの範*

* 囲のスペクトルを表す図である。

【図12】III-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が3.00ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図13】III-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.85ppmから2.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図14】IX-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.60ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図15】X-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.85ppmから2.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図16】X-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が3.00ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図17】XI-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.60ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

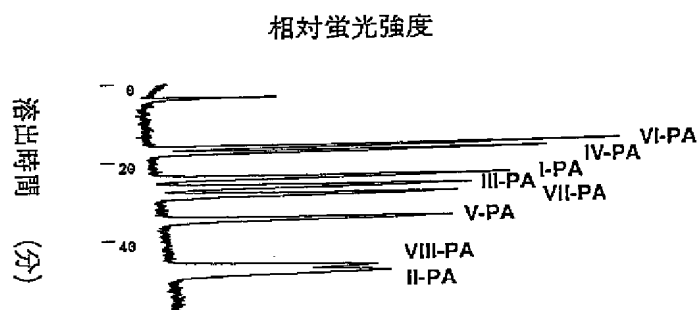
【図18】XII-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.60ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図19】XIII-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.60ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

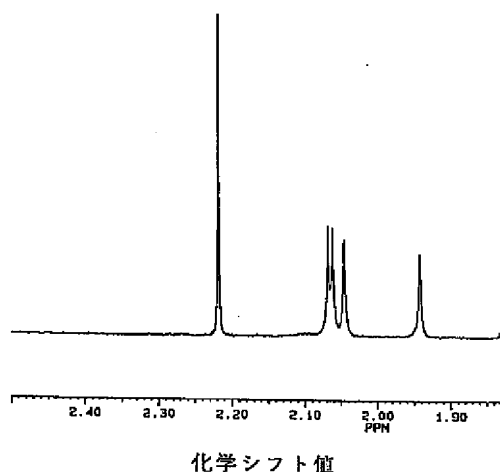
【図20】XIV-PAの ^1H -NMRスペクトルのうち、化学シフト値が1.60ppmから5.50ppmの範囲のスペクトルを表す図である。

【図21】 α -Manに β -1,6結合しているGNを保護した糖鎖を、ウシ腎臓由来の β -N-アセチルグルコサミニダーゼで部分消化したものをHPLCに供したときのチャートを示す図である。

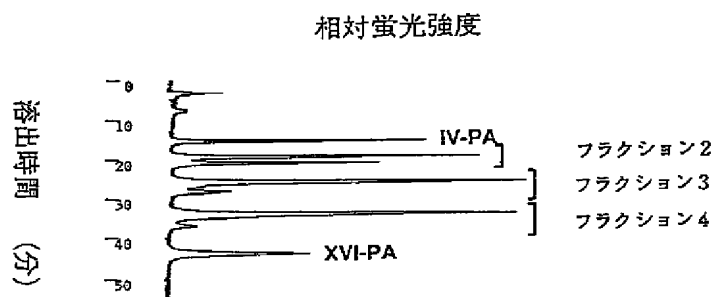
【図1】



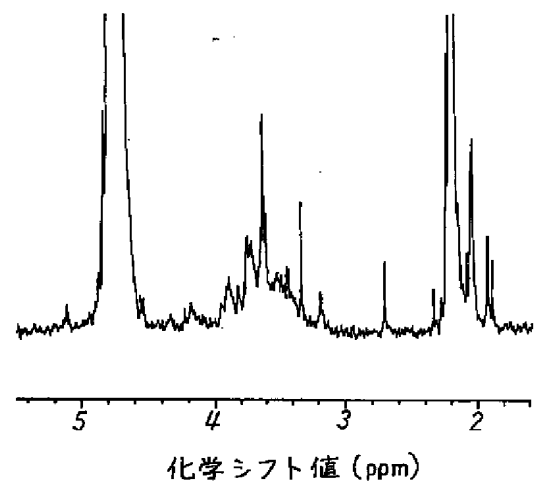
【図13】



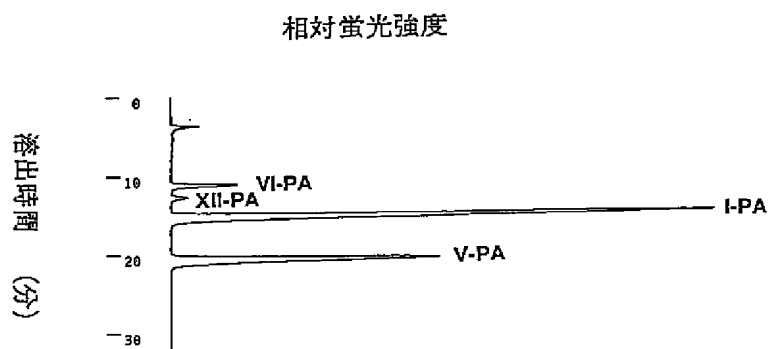
【図2】



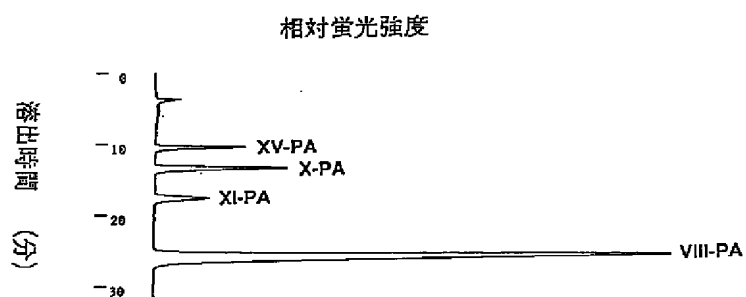
【図14】



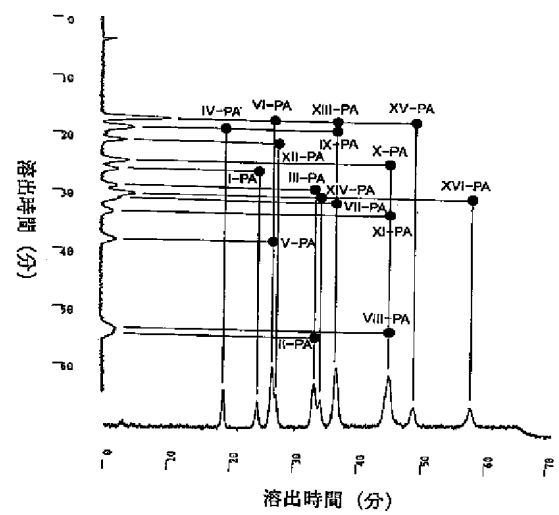
【図3】



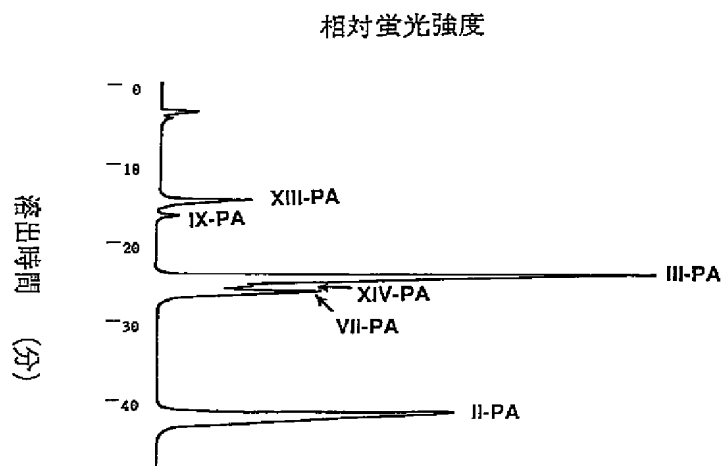
【図4】



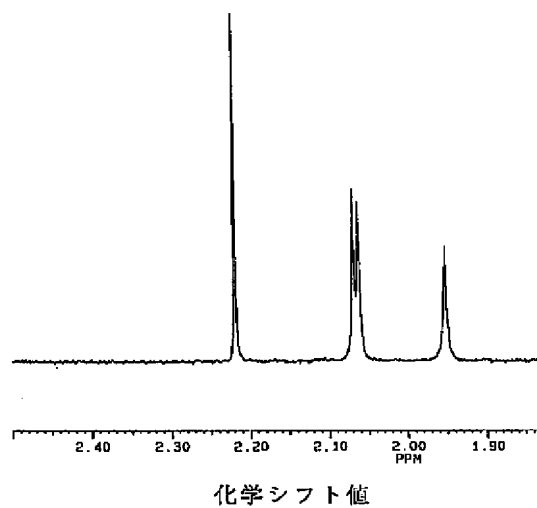
【図7】



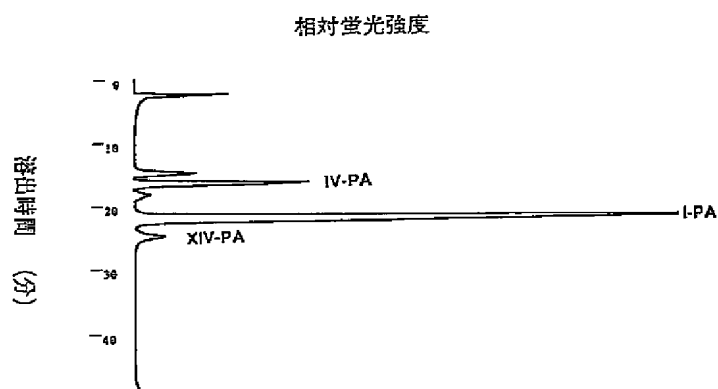
【図5】



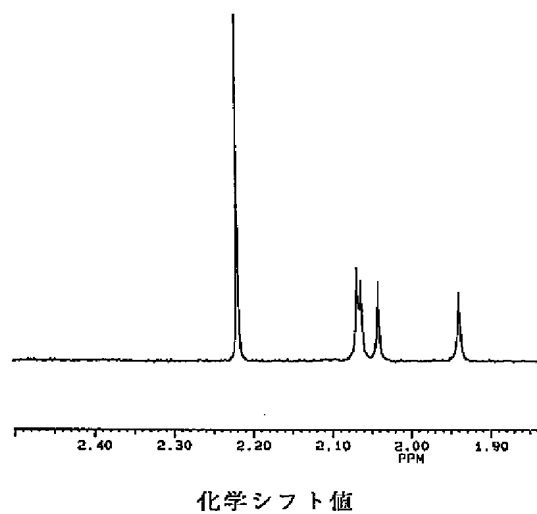
【図9】



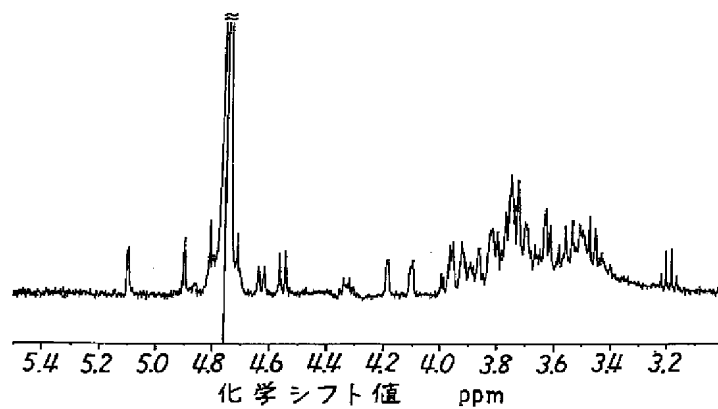
【図6】



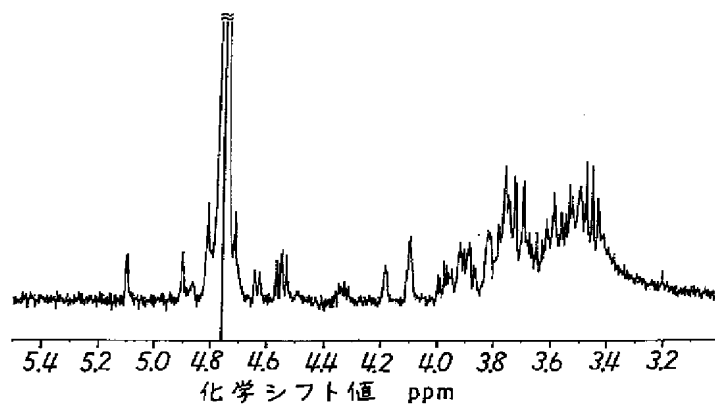
【図11】



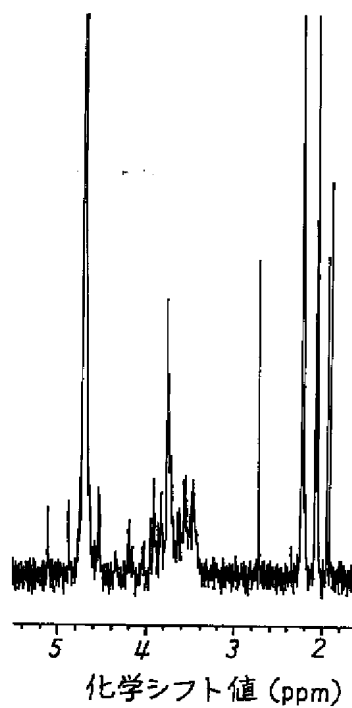
【図8】



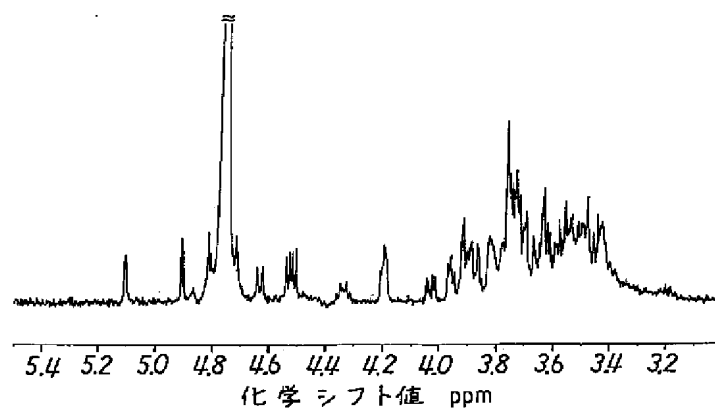
【図10】



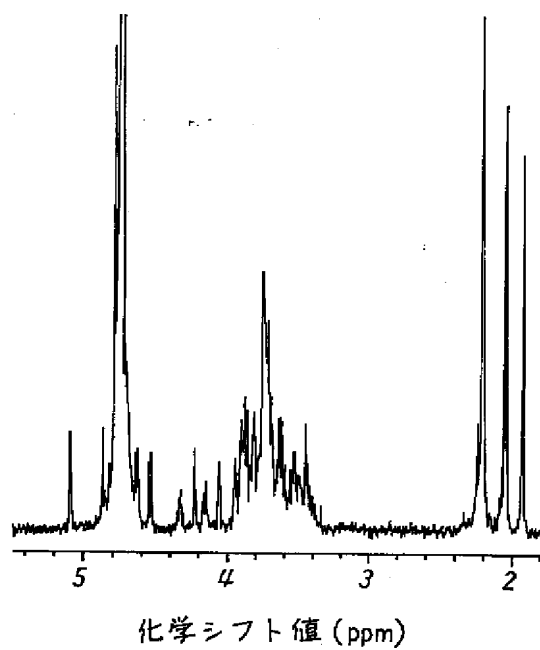
【図17】



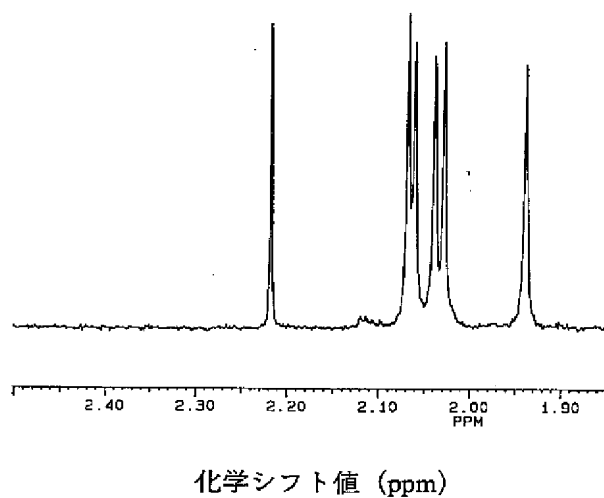
【図12】



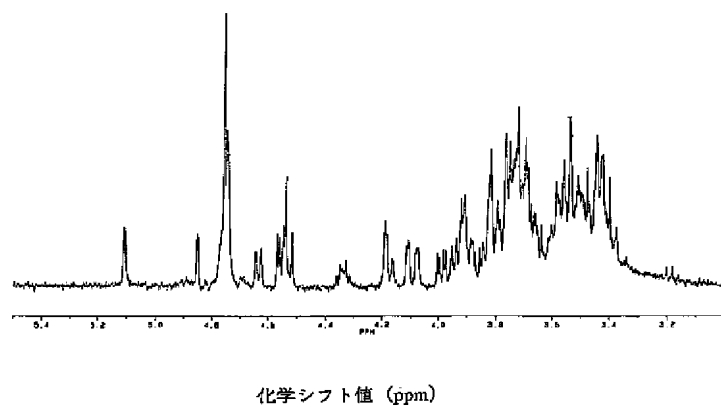
【図18】



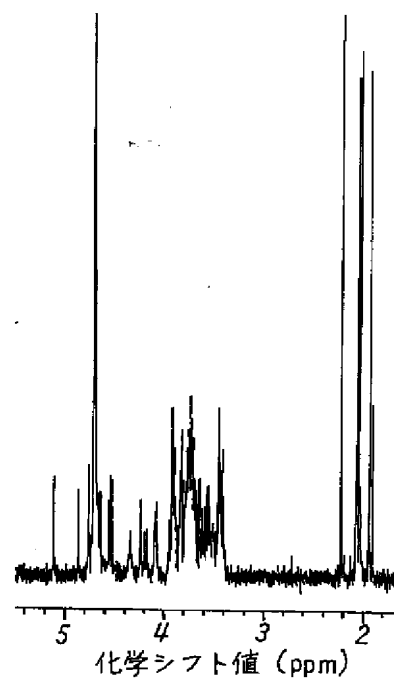
【図15】



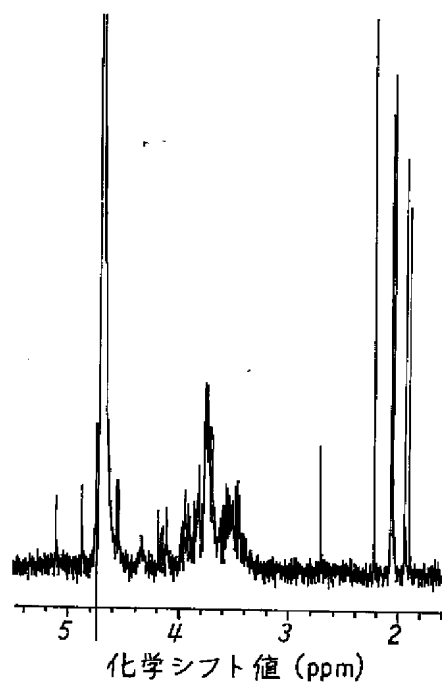
【図16】



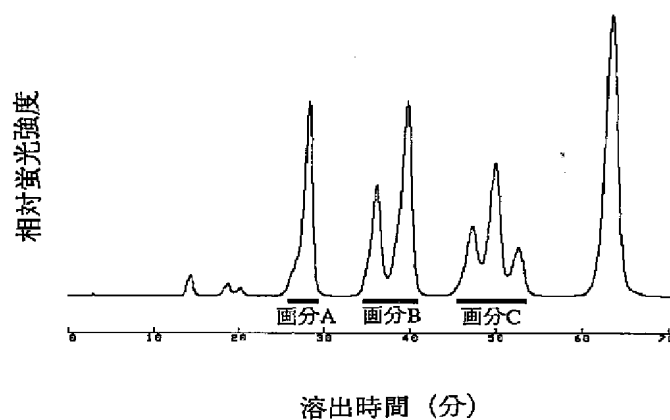
【図19】



【図20】



【図21】



フロントページの続き

(72)発明者 加藤 郁之進
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 3 部門第 2 区分
 【発行日】平成 10 年（1998）11 月 10 日

【公開番号】特開平 7-112996
 【公開日】平成 7 年（1995）5 月 2 日
 【年通号数】公開特許公報 7-1130
 【出願番号】特願平 6-179748
 【国際特許分類第 6 版】

C07H 15/12
 5/04

C12Q 1/34

【F I】

C07H 15/12
 5/04

C12Q 1/34

【手続補正書】
 【提出日】平成 7 年 9 月 19 日
 【手続補正 1】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0085
 【補正方法】変更
 【補正内容】

【0085】本発明の方法に用いる試薬類をまとめてキット化しておくことにより、糖鎖構造の決定を更に簡便に行うことができる。キットは式（化 1）で表されるオリゴ糖の少なくとも 1 種を含有しておればよいが、式（化 9）又は式（化 10）で表される他のオリゴ糖を含

有してもよい。例えば、I-PA~VII-PA を含有するキットは、N-アセチルラクトサミン型糖鎖のうち、式（化 6）において、 $1_1 = 1_3 = 0$ 、 $1_2 = 1_4 = 1$ である 2 本鎖、又は式（化 6）において、 $1_1 = 0$ 、 $1_2 = 1_3 = 1_4 = 1$ である 3 本鎖の糖鎖の分析に特に有用であり、例えば I-PA~XV-PA を含有するキットは広く N-アセチルラクトサミン型糖鎖の分析に有用である。また、キット中にはオリゴ糖のほかにグリコンダーゼ、分析用のカラム、緩衝液等を含有してもよい。なお、キットに含まれる試薬類は溶液状でもよく、凍結乾燥物でもよい。